



**Untersuchung der *in vitro* Modulation
immunkompetenter Zellen zur präklinischen
Bestimmung des immunogenen Potenzials
von Biologika**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nicole Wöffen

aus Düsseldorf

Ratingen, Juni 2018

aus dem Institut für Toxikologie
der Bayer AG in Wuppertal

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Hans-Werner Vohr
2. Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 31.08.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Das angeborene Immunsystem	1
1.1.2 Das adaptive Immunsystem.....	4
1.2 Biologika	9
1.2.1 Adverse Effekte von Biologika: Das Problem der Immunogenität.....	11
1.2.2 Induktion immunogener Reaktionen	13
1.2.3 Therapeutische monoklonale Antikörper.....	18
1.2.3.1 Therapeutische Wirkmechanismen.....	20
1.2.3.2 Adverse Effekte monoklonaler Antikörper	21
1.2.3.3 Klinische Erfahrungen mit monoklonalen Antikörpern	25
1.2.4 Methoden zur Identifikation potenzieller Immunogenität	29
1.3 Ziel der Arbeit	31
2 Material und Methoden	32
2.1 Material	32
2.1.1 Standardlabormaterialien.....	32
2.1.2 Chemikalien, Puffer und Lösungen	34
2.1.3 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen.....	35
2.1.4 Kulturmedien und Zusätze	36
2.1.5 Stimulantien.....	36
2.1.6 Kommerzielle Testsysteme (Kits).....	37
2.1.7 Laborgeräte	37
2.1.8 Software	39
2.1.9 Zellen	39
2.1.10 Medien und Lösungen	40
2.2 Methoden	42
2.2.1 Allgemeine Zellkultur	42
2.2.1.1 Isolation humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut	42
2.2.1.2 Zellzahlbestimmung.....	43
2.2.1.2.1 Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer	43

2.2.1.2.2	Konduktometrische Zellzahlbestimmung	43
2.2.1.3	Kryokonservierung und Revitalisierung von Primärzellen	44
2.2.1.4	Magnetische Zellseparation.....	44
2.2.1.5	Durchflusszytometrische Zellpopulationsanalyse	45
2.2.2	Generierung und Charakterisierung humaner dendritischer Zellen.....	47
2.2.2.1	Generierung dendritischer Zellen aus humanen Monozyten.....	47
2.2.2.2	Messung der Endozytose.....	47
2.2.2.3	Anfertigung von Zytospins und Färbung nach Pappenheim.....	48
2.2.2.4	Reifung dendritischer Zellen.....	48
2.2.3	<i>In vitro</i> Kokulturen humaner immunkompetenter Zellen.....	49
2.2.3.1	Proliferationstest mittels PKH26-Membranmarkierung	49
2.2.3.2	Kokultivierung dendritischer Zellen mit autologen T-Lymphozyten	50
2.2.3.3	Gemischte Lymphozytenreaktion	51
2.2.3.3.1	Mitomycin C-Behandlung der Stimulator-Zellpopulation	51
2.2.3.3.2	Klassische und erweiterte MLR.....	51
2.2.4	Cytokine Release Assay	54
2.2.4.1	Vollblut-Methode	54
2.2.4.2	PBMC-Methode.....	54
2.2.5	Monozyten-Aktivierungstest	55
2.2.6	BCA-Assay zur Proteinbestimmung	55
2.2.7	Nachweis von Zytokinen mittels Elektrochemilumineszenz (MSD)	56
2.2.8	Generierung und Analyse von Aggregaten.....	57
2.2.8.1	Thermaler Stress.....	57
2.2.8.2	Dynamische Lichtstreuung	57
2.2.9	Statistische Analysen und Darstellungen.....	58
3	Ergebnisse	61
3.1	<i>In vitro</i> Kokultur humaner dendritischer Zellen mit T-Lymphozyten	61
3.1.1	Generierung und Charakterisierung humaner dendritischer Zellen.....	61
3.1.2	Messung der Endozytosefähigkeit dendritischer Zellen	67
3.1.3	Etablierung von Positivkontrollen zur Zellaktivierung	70
3.1.4	Einfluss von Modell-Antigenen auf die Zellen einer Kokultur	75
3.1.4.1	Analyse der Primärantwort auf KLH und OVA	75
3.1.4.2	Untersuchung der Modell-Antigene auf Endotoxine.....	86
3.1.4.3	Analyse der Sekundärantwort auf KLH.....	87
3.1.5	Einfluss therapeutischer monoklonaler Antikörper auf die Zellen einer Kokultur ..	93
3.1.5.1	Analyse der Primärantwort	93

3.1.5.2	Einfluss einer Aggregatbildung auf die Primärreaktion	96
3.2	Gemischte Lymphozytenreaktion	102
3.2.1	Wirkung von Mitomycin C auf die Zellproliferation von PBMCs	102
3.2.2	Gemischte Lymphozytenreaktion – Klassische MLR.....	103
3.2.3	MLR Restimulation – erweiterte MLR	107
3.3	Cytokine Release Assay	112
3.3.1	Methodenoptimierung	112
3.3.1.1	Etablierung der optimalen Stimulationsdauer.....	112
3.3.1.2	Einfluss unterschiedlicher Zellkulturplatten auf die Zytokinsekretion von PBMCs	113
3.3.1.3	Analyse induzierter Zytokinsekretionen.....	115
3.3.2	Vergleichende Analyse: Vollblut-Methode vs. PBMC-Methode	117
4	Diskussion.....	136
4.1	<i>In vitro</i> Assay zur Abbildung induzierter Immunreaktionen.....	136
4.1.1	Charakterisierung <i>in vitro</i> generierter dendritischer Zellen	136
4.1.1.1	Immunphänotyp unreifer dendritischer Zellen	137
4.1.1.2	Morphologische Charakterisierung	138
4.1.1.3	Endozytische Fähigkeit.....	139
4.1.1.4	Einfluss von Reifungsstimuli auf den Immunphänotyp	141
4.1.1.5	Einfluss von Reifungsstimuli auf die T-Zell-stimulatorische Fähigkeit.....	145
4.1.2	Primärantwort auf Modell-Antigene <i>in vitro</i>	148
4.1.3	Sekundärantwort auf das Modell-Antigen KLH <i>in vitro</i>	156
4.1.4	Primärantwort auf therapeutische monoklonale Antikörper <i>in vitro</i>	160
4.1.5	Maximale Immunreaktionen <i>in vitro</i> mittels allogenem Stimulus.....	167
4.2	<i>In vitro</i> Assay zur Vorhersage systemischer Zytokinfreisetzungen	170
4.2.1	Reaktionen therapeutischer Antikörper im <i>Cytokine Release Assay</i>	173
4.2.2	Clusteranalyse als Hilfsmittel zur Gefahrenidentifikation	185
4.3	<i>In vitro</i> Modelle zur Detektion potenzieller Immunogenität von Biologika	188
5	Zusammenfassung	190
6	Summary	192
	Literaturverzeichnis.....	XI
	Eidesstattliche Erklärung.....	XXXV

Abkürzungsverzeichnis

ADA	<i>Anti-drug</i> -Antikörper
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
<i>A. dest.</i>	Destilliertes Wasser (<i>Aqua destillatum</i>)
ADR	Arzneimitteln Nebenwirkungen (<i>adverse drug reaction</i>)
AICD	Aktivierungs-induzierter Zelltod (<i>activation-induced cell death</i>)
AOP	<i>Adverse Outcome Pathway</i>
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen-presenting cell</i>)
BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
BCR	B-Zell-Rezeptor (<i>B cell receptor</i>)
BrdU	Bromdesoxyuridin (<i>5-Bromo-2'-deoxyuridine</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDCC	Komplementabhängige Zytotoxizität (<i>complement-dependent cytotoxicity</i>)
CDR	Antigenbindungsstelle (<i>complementarity determining region</i>)
CD28SA	CD28-Superagonist
CI	Kontaktinhibition (<i>contact inhibition</i>)
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
ConA	Concanavalin A
CRA	<i>Cytokine Release Assay</i>
CRS	<i>Cytokine Release</i> Syndrom
CTL	Zytotoxische T-Zelle (<i>cytotoxic T lymphocytes</i>)
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DLS	Dynamische Lichtstreuung (<i>dynamic light scattering</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DX	Dextran
EdU	Ethynyl-desoxyuridin (<i>5-Ethynyl-2'-deoxyuridine</i>)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur (<i>European Medicines Agency</i>)
EPO	Erythropoetin

Fab-Fragment	Antigenbindende Fragment (<i>fragment antigen binding</i>)
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
Fc-Fragment	Kristallisierbares Fragment (<i>fragment crystallizable</i>)
Fc(γ)R	Fc(gamma)-Rezeptor
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FDA	Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde der Vereinigten Staaten (<i>Food and Drug Administration</i>)
FIH-Studien	<i>First-In-Human</i> -Studien
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HACA	Humane anti-chimär Antikörper
HAHA	Humane anti-humanisiert Antikörper
HAMA	Humane anti-murin Antikörper
HCA	Hierarchische Clusteranalyse (<i>hierarchical clustering</i>)
HLA	Humane Leukozytenantigen (<i>human leukocyte antigen</i>)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
huALN	Artifizieller humaner Lymphknoten (<i>human artificial lymph node</i>)
ICH	<i>International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-2-R	Interleukin-2-Rezeptor
KLH	<i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetische Zellseparation (<i>magnetic-activated cell sorting</i>)
mAk	Monoklonaler Antikörper
MAT	Monozyten-Aktivierungstest
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MitC	Mitomycin C
MLR	Gemischte Lymphozytenreaktion (<i>mixed lymphocyte reaction</i>)
moDC	Monozyten-abgeleitete dendritische Zelle (<i>monocyte-derived dendritic cell</i>)

mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NK / PK / Ktrl	Negativkontrolle / Positivkontrolle / Kontrolle
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PAMP	Pathogenassoziierte molekulare Muster (<i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBS-T	Phosphatgepufferte Salzlösung-Tween
PCA	Hauptkomponentenanalyse (<i>principal component analysis</i>)
PE	Phycoerythrin
PGE2	Prostaglandin E2
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumiodid
PP	Polypropylen
PRR	Mustererkennungsrezeptor (<i>pattern recognition receptor</i>)
PS	Polystyren
R	<i>Responder</i> -Zellen
Rh	Hydrodynamischer Radius
RT	Raumtemperatur
S	Stimulator-Zellen
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>side scatter</i>)
TC	T-Zelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	Tripropylamin
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor (<i>TNF-receptor-associated factor</i>)
T _{reg} -Zelle	Regulatorische T-Zelle
ü.N.	Über Nacht
2-ME	β-Mercaptoethanol

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Entwicklung des biopharmazeutischen Marktes - Neue FDA Zulassungen von 1993 bis 2016.....	10
Abbildung 2:	Bereiche therapeutischer Indikationen und Zielmoleküle zugelassener Biopharmazeutika (1982 bis 2013)	11
Abbildung 3:	Einfluss diverser Faktoren auf die Antigenprozessierung und -präsentation von APCs.....	17
Abbildung 4:	Gentechnisch modifizierte monoklonale Antikörper für die therapeutische Anwendung	18
Abbildung 5:	Struktur und Wirkmechanismen von monoklonalen Antikörpern	20
Abbildung 6:	Mechanismen zur Induktion eines <i>Cytokine Release</i> Syndroms (CRS)	23
Abbildung 7:	Immunogenitätslevel von monoklonalen Antikörpern unterschiedlicher molekularer Formate im Vergleich.....	27
Abbildung 8:	Prinzip der Biocoll-Dichtegradientenzentrifugation	42
Abbildung 9:	Schematische Darstellung des Prinzips der hydrodynamischen Fokussierung bei der durchflusszytometrischen Analyse.....	45
Abbildung 10:	Aufbau eines Durchflusszytometers	46
Abbildung 11:	Schema der Ansätze und analysierten Endpunkte der erweiterten MLR zur <i>in vitro</i> Stimulation von T-Lymphozyten.....	53
Abbildung 12:	Native und aggregierte therapeutische monoklonale Antikörper	57
Abbildung 13:	Reinheitsanalyse der aus PBMCs aufgereinigten CD14 ⁺ Monozyten.....	61
Abbildung 14:	Durchflusszytometrische Analyse der Entwicklung der Oberflächenmarker während der Differenzierung von Monozyten zu moDCs	65
Abbildung 15:	Exemplarische durchflusszytometrische Analyse zur Überprüfung der Differenzierung von Monozyten zu moDCs an Tag 6.....	65
Abbildung 16:	Morphologischer Vergleich von Monozyten und moDCs	66
Abbildung 17:	Analyse der Differenzierung von Monozyten zu moDCs anhand der Oberflächenmarker CD14 und CD11c an Tag 8.....	66
Abbildung 18:	Exemplarische Histogramme einer durchflusszytometrischen Analyse der Akkumulation von DX-FITC und OVA-FITC in moDCs an Tag 6 der Kultur	68
Abbildung 19:	Durchflusszytometrische Analyse der Endozytose von FITC-markierten Molekülen durch Monozyten und sich zu moDCs differenzierenden Zellen	69
Abbildung 20:	Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses von TNF- α auf die Endozytose von DX-FITC durch Monozyten und moDCs an Tag 6 der Kultur	70
Abbildung 21:	Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf moDCs nach Stimulation mit unterschiedlichen Reifungsstimuli.....	72

Abbildung 22: Alternative durchflusszytometrische Analyse der HLA-DR-Expression von moDCs nach Stimulation mit unterschiedlichen Reifungsstimuli.....	73
Abbildung 23: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Proliferation (PKH26) und der Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf T _H -Zellen nach sechstägiger Kokultivierung mit spezifisch gereiften moDCs.....	74
Abbildung 24: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf moDCs nach Reifung mit KLH	76
Abbildung 25: Alternative durchflusszytometrische Analyse der HLA-DR-Expression von moDCs nach Reifung mit KLH	77
Abbildung 26: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf moDCs nach Reifung mit KLH +/- LPS	79
Abbildung 27: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Proliferation (PKH26) und der Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf T _H -Zellen nach sechstägiger Kokultivierung mit KLH- (+/- LPS) gereiften moDCs.....	81
Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf moDCs nach Reifung mit OVA.....	83
Abbildung 29: Alternative durchflusszytometrische Analyse der HLA-DR-Expression von moDCs nach Reifung mit OVA.....	83
Abbildung 30: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Proliferation (PKH26) und der Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf T _H -Zellen nach sechstägiger Kokultivierung mit OVA-gereiften moDCs	84
Abbildung 31: Exemplarische Histogramme einer durchflusszytometrischen Analyse der Proliferation von CD4 ⁺ T _H -Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26 an Tag 6 einer Kokultur mit spezifisch gereiften moDCs	85
Abbildung 32: Sekretion der Zytokine IL-2, IFN- γ , IL-10, IL-6 und TNF- α im zeitlichen Verlauf einer erweiterten Kokultur mit Merck-KLH über 16 Tage mit Restimulationen an Tag 7 und 14.....	90
Abbildung 33: Durchflusszytometrische Viabilitätsanalyse mittels PI am Ende einer erweiterten Kokultur (Tag 16) mit Merck-KLH.....	91
Abbildung 34: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarkerexpression von moDCs nach spezifischer Reifung mit OKT3 sowie des Aktivierungsprofils von T _H -Zellen nach Kokultivierung mit OKT3-gereiften moDCs.....	94
Abbildung 35: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarkerexpression von moDCs nach spezifischer Reifung mit MabThera sowie des Aktivierungsprofils von T _H -Zellen nach Kokultivierung mit MabThera-gereiften moDCs	96
Abbildung 36: DLS-Analyse am Beispiel von Remicade	98

Abbildung 37: Durchflusszytometrische Analyse des Aktivierungsprofils von T _H -Zellen nach sechstägiger Kokultivierung mit OKT3-gereiften moDCs	99
Abbildung 38: Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses von nativem und aggregiertem Remicade auf das Aktivierungsprofil von moDCs und T _H -Zellen.....	101
Abbildung 39: Titration der optimalen MitC-Konzentration zur Inhibierung der Proliferation von PBMCs.....	103
Abbildung 40: Gemischte Lymphozytenreaktion – Analyse der Proliferation und CD25-Expression von T _H -Zellen nach sechstägiger MLR.....	106
Abbildung 41: Schema der Ansätze und analysierten Endpunkte der erweiterten MLR zur <i>in vitro</i> Stimulation von T-Lymphozyten.....	108
Abbildung 42: Kontrolle der Proliferation der (Re-)Stimulator-PBMCs zu unterschiedlichen Zeitpunkten der erweiterten MLR	109
Abbildung 43: Analyse der T-Zell-Proliferation (PKH26) und der Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf T _H -Zellen im Rahmen einer erweiterten MLR mit Restimulation an Tag 6	111
Abbildung 44: Repräsentative Darstellung induzierter Sekretionen der Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2 nach Stimulation mit monoklonalen Antikörpern für 6, 24 und 48 Stunden zur Etablierung der optimalen Stimulationsdauer	113
Abbildung 45: Vergleich des Einflusses von Polystyren (PS)- und Polypropylen (PP)-Platten auf die Sekretion der Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-2 und IL-1 β durch PBMCs nach Stimulation mit immobilisierten monoklonalen Antikörpern	114
Abbildung 46: Induzierte Reaktionen am Beispiel der Sekretion des Zytokins IL-10	116
Abbildung 47: Frequenzen positiver Reaktionen und Konzentrationen sezernierter Zytokine im Vollblut nach <i>in vitro</i> Stimulation mit therapeutischen monoklonalen Antikörpern.....	122
Abbildung 48: Frequenzen positiver Reaktionen und Konzentrationen sezernierter Zytokine nach <i>in vitro</i> Stimulation von aufgereinigten PBMCs mit therapeutischen monoklonalen Antikörpern.....	128
Abbildung 49: Analyse der induzierten Reaktionen im Vollblut auf die <i>in vitro</i> Stimulation mit therapeutischen monoklonalen Antikörpern.....	130
Abbildung 50: Analyse der induzierten Reaktionen von aufgereinigten PBMCs auf die <i>in vitro</i> Stimulation mit therapeutischen monoklonalen Antikörpern.....	132
Abbildung 51: Vergleich der Vollblut- und PBMC-Methode anhand der Konzentrationen induzierter Zytokine am Beispiel von IFN- γ , TNF- α und IL-2.....	135

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Kategorisierung immuntoxischer Effekte von Biopharmazeutika und damit assoziierte adverse klinische Konsequenzen	11
Tabelle 2:	Faktoren zur Begünstigung immunogener Reaktionen auf Biologika	14
Tabelle 3:	Targets therapeutischer monoklonaler Antikörper	19
Tabelle 4:	Relevante therapeutische monoklonale Antikörper im Rahmen der vorliegenden Dissertation	28
Tabelle 5:	Experimentell verwendete (therapeutische) monoklonale Antikörper zur <i>in vitro</i> Stimulation humaner Zellen	37
Tabelle 6:	Experimentell verwendete Zellen und deren Bezugsquelle.....	39
Tabelle 7:	Eingesetzte Positivkontrollen, Modell-Antigene und monoklonale Antikörper zur spezifischen Reifung von moDCs.....	49
Tabelle 8:	Analyse der Reproduzierbarkeit der Generierung von moDCs aus Monozyten am Beispiel eines Donors.....	67
Tabelle 9:	Endotoxingehalt verschiedener KLH- und OVA-Produkte im Vergleich	86
Tabelle 10:	Ergebnisse der DLS-Analyse der nativen und aggregierten monoklonalen Antikörper.....	97

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Der menschliche Körper wird durch die mechanische Barrierefunktion der Oberflächenepithelien vor dem Eindringen von Pathogenen wie Bakterien, Viren und Parasiten und vor schädlichen Substanzen wie Toxinen geschützt. Biochemische Mechanismen wie Enzyme und antimikrobielle Peptide unterstützen die Abwehr und Bekämpfung solcher äußeren Einflüsse (Gallo *et al.*, 2002). Werden diese Barrieren überwunden, schützt das Immunsystem den Organismus vor Schäden durch Pathogene und toxische Noxen. Darüber hinaus schützt es vor körpereigenen entarteten oder infizierten Zellen.

Bei der Induktion einer Immunreaktion hat das Immunsystem vier Hauptaufgaben zu erfüllen. Die erste Aufgabe, und Voraussetzung für die Einleitung einer Immunreaktion, ist die Erkennung eines Pathogens und die damit einhergehende Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen. Die zweite Aufgabe besteht in der Abwehr und Bekämpfung des Erregers. Gleichzeitig muss sichergestellt werden, dass das Immunsystem dem Körper hierbei keinen Schaden zufügt. Diese Selbstregulation stellt eine weitere wichtige Aufgabe dar, da das Versagen einer solchen Regulation zur Entstehung von Allergien oder Autoimmunerkrankungen führen kann. Die vierte Aufgabe ist letztendlich die Entwicklung einer protektiven Immunität, das sogenannte immunologische Gedächtnis, welches den Körper vor einem erneuten Auftreten eines bereits bekannten Erregers schützt und eine schnellere und effektivere Immunantwort ermöglicht.

Zur Erfüllung dieser Aufgaben wirkt das Immunsystem als komplexes biologisches Netzwerk, dessen zelluläre und humorale Bestandteile im gesamten Körper verteilt sind. Primäre und sekundäre lymphatische Organe bilden über die Blutbahnen des lymphatischen Systems einen Kreislauf, in dem verschiedene immunkompetente Zellen, Botenstoffe und Moleküle für die Induktion einer Immunantwort sorgen. Unterschieden wird hierbei zwischen zwei interagierenden Effektorsystemen: der angeborenen (unspezifischen) und erworbenen, adaptiven (spezifischen) Immunantwort (Medzhitov und Janeway, 1997).

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Die Abwehrsysteme des angeborenen, unspezifischen Immunsystems sind die ersten Effektorreaktionen, die nach dem Eindringen von Pathogenen oder Fremdstoffen wirksam werden. Sie sind die Grundlage für eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Die wesentlichen Funktionen des angeborenen Immunsystems bestehen aus der Identifizierung und Eliminierung eingedrungener Pathogene mittels Phagozytose und dem Abtöten infizierter Zellen. Zu den humoralen Bestandteilen des angeborenen Immunsystems zählen antibakterielle

und antivirale Substanzen wie Interleukine und Interferone, Lysozym und die Plasmaproteine des Komplementsystems. Letztere induzieren eine Zell-Lyse, indem die verschiedenen Plasmaproteine in Kaskaden aktiviert werden und zur Porenbildung in der Membran der Zielzelle führen. Die zellulären Mechanismen werden durch Mastzellen, Makrophagen, unterschiedlich spezialisierte Granulozyten (Neutrophile, Basophile, Eosinophile) sowie NK- und dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs) ausgeübt, welche mit Ausnahme der NK-Zellen von myeloiden Vorläuferzellen abstammen.

NK-Zellen entstehen aus der lymphatischen Zelllinie, sind jedoch nicht für ein Antigen spezifisch und bilden somit einen Teil des angeborenen Immunsystems. Ihre Aufgaben sind die frühe Erkennung von anormalen Zellen, wie beispielsweise entartete oder infizierte Zellen, anhand Tumor- oder Virus-spezifischer Antikörper auf den Zielzellen, und deren Abtötung via Lyse mittels spezieller Proteine (Perforine und Granzyme) (Vivier *et al.*, 2008).

Primär wird die angeborene Immunität jedoch durch Phagozyten vermittelt. Zu den professionellen phagozytierenden Zellen gehören die neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und DCs (Aderem und Underhill, 1999; Lee *et al.*, 2003; Sallusto *et al.*, 1995).

Neutrophile Granulozyten sind Zellen des angeborenen Immunsystems, die erst bei Inflammation in das betroffene Gewebe rekrutiert werden. Sie phagozytieren Pathogene und bauen diese durch proteolytische Enzyme und antimikrobiellen Molekülen ab, welche in ihren zytoplasmatischen Granula gespeichert sind (Lee *et al.*, 2003). Eosinophile und Basophile enthalten ebenfalls Enzyme und toxische Proteine in ihren Granula. Sie sind bei der Abwehr von Parasiten, die zu groß sind um mittels Phagozytose eliminiert zu werden, von Bedeutung (Rothwell und Love, 1975).

Makrophagen hingegen sind nach ihrer Differenzierung aus Monozyten in allen Geweben zu finden und bilden eine wichtige erste Abwehrlinie des angeborenen Immunsystems. Ihre Hauptaufgabe ist die Eliminierung von Pathogenen durch Phagozytose und deren Abbau mittels proteolytischer Enzyme. In Folge dieser Zellaktivierung sezernieren Makrophagen darüber hinaus Signalproteine (Zytokine, Chemokine), die weitere Immunzellen aktivieren und zu einer Immunantwort mobilisieren (Aderem und Underhill, 1999).

Einen weiteren phagozytotischen Zelltyp des angeborenen Immunsystems stellen die DCs dar, die sowohl myeloiden als auch lymphoiden Ursprungs sein können (Ardavin *et al.*, 1993; Caux *et al.*, 1996). Die überwiegende Anzahl der DCs entsteht jedoch aus myeloiden Vorläuferzellen. In unreifer Form sind DCs in fast allen Geweben zu finden und zeichnen sich durch eine ausgeprägte Fähigkeit zur Antigenaufnahme aus, indem sie über eine hohe endozytotische Aktivität verfügen (Banchereau und Steinman, 1998; Cella *et al.*, 1997). Internalisierte Antigene werden von unreifen DCs durch Proteolyse zu Peptidfragmenten prozessiert und schließlich in den Bindungsfurchen spezialisierter, zelleigener Proteine, den MHC-Molekülen (*major histocompatibility complex*; MHC), gebunden (Germain, 1994; Germain und Margulies, 1993).

Die Hauptfunktion der DCs liegt darin, Pathogene und ihre Antigene durch rezeptorvermittelte Phagozytose sowie rezeptorunabhängige Makropinozytose aufzunehmen und, durch Chemokine geleitet, über die Lymphgefäße zu regionalen Lymphknoten zu wandern. Dort initiieren sie letztendlich eine adaptive Immunantwort, indem sie Peptidfragmente des Erregers, an MHC gebunden, auf ihrer Oberfläche naiven T-Lymphozyten präsentieren und diese aktivieren (Levin *et al.*, 1993; Medzhitov *et al.*, 1997; Sallusto *et al.*, 1995; Svensson *et al.*, 1997). Aus diesem Grund werden DCs auch als hochspezialisierte antigenpräsentierende Zellen (*antigen-presenting cells*; APCs) bezeichnet. Sie bilden ein entscheidendes Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunabwehr (Cella *et al.*, 1997). Zwar verfügen auch Makrophagen über die Fähigkeit zur Antigenpräsentation, allerdings ist sie bei diesem Zelltyp weitaus weniger ausgeprägt, sodass den DCs die entscheidende Rolle bei der Initiierung einer adaptiven Immunreaktion zukommt.

Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen

Die Erkennung körperfremder, pathogener Antigene durch das angeborene Immunsystem beruht auf einem begrenzten Repertoire keimbahn-codierter Rezeptoren. Makrophagen, Neutrophile und DCs identifizieren Pathogene mittels Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*; PRRs). PRRs sind in der Lage, repetitive Muster auf der Oberfläche von Erregern, sogenannte pathogenassoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular pattern*; PAMP), zu erkennen und zu binden (Janeway, 1992a; Medzhitov und Janeway, 1997). Diese evolutionär stark konservierten Strukturen kommen lediglich auf der Oberfläche von Pathogenen, jedoch nicht auf körpereigenen Zellen vor (Aderem und Ulevitch, 2000; Aderem und Underhill, 1999; Janeway und Medzhitov, 2002). Hierzu zählen beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS) in der äußeren Membran gram-negativer Bakterien oder Peptidoglykane in der bakteriellen Zellwand. Zu den PRRs zählen eine Reihe von Phagozytose- und Signalrezeptoren. Die Erkennung von PAMP durch PRRs kann folglich sowohl die Phagozytose des Pathogens induzieren (Phagozytoserezeptoren) als auch eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzen (Signalrezeptoren). Zu den Phagozytoserezeptoren zählen beispielsweise die C-Typ-Lektin- und die *Scavenger*-Rezeptoren (Lee *et al.*, 2003; Geijtenbeek und Gringhuis, 2009; Gough und Gordon, 2000). Neben der Erkennung von PAMP kann Phagozytose auch durch Rezeptoren induziert werden, die entsprechend opsonisierte Pathogene erkennen. So binden Komplementrezeptoren Pathogene, welche durch die Plasmaproteine des Komplementsystems markiert wurden (Aderem und Underhill 1999; Carroll, 1998). Antikörper-markierte Pathogene hingegen werden durch Fc-Rezeptoren (FcRs) erkannt (Aderem und Underhill, 1999; Ravetch und Kinet, 1991). Zu den Signalrezeptoren zählen die *Toll-like* Rezeptoren (TLRs), die proinflammatorische Signalwege aktivieren und zur Induktion eines breiten Spektrums an Effektormechanismen, wie beispielsweise der Genexpression

inflammatorischer Zytokine, führen (Aderem und Underhill, 1999; Medzhitov *et al.*, 1997). Der bekannteste Vertreter der TLRs ist TLR-4, über den unter anderem LPS erkannt wird (Hoshino *et al.*, 1999; Poltorak *et al.*, 1998; Schwartz, 2001). Hierbei interagiert LPS mit einem Komplex aus Rezeptoren (*LPS-activation cluster*), der auch den TLR-4 beinhaltet, und induziert eine Entzündungsreaktion, die mit einer Zytokinsekretion durch die Effektorzellen einhergeht (da Silva *et al.*, 2001; Pfeiffer *et al.*, 2001; Triantafilou und Triantafilou, 2002; Triantafilou *et al.*, 2004; Visintin *et al.*, 2003). Die TLRs stellen somit eine wichtige Verbindung zwischen Pathogenerkennung und Einleitung der adaptiven Immunantwort dar (Janeway und Medzhitov, 2002; Medzhitov *et al.*, 1997). Hervorzuheben ist, dass die Mehrheit der Pathogene von mehr als nur einem Rezeptor erkannt werden kann und diese Rezeptoren zu Kreuzreaktionen (*cross-talk*) und Synergien fähig sind (Aderem und Underhill, 1999).

Nach Erkennung eines Pathogens und seiner Phagozytose infolge einer Aktivierung der PRRs, wird es intrazellulär durch toxische Moleküle, proteolytische Enzyme, reaktive Sauerstoffspezies und den sauren pH im Phagosom zerstört (Janeway, 1992a; Lee *et al.*, 2003). Zudem kann die Aktivierung von PRRs die Freisetzung inflammatorischer Zytokine und Chemokine auslösen, was zur Induktion einer Immunantwort führt (Aderem und Underhill, 1999). Die von Makrophagen sezernierten Proteine sind in der Lage, Entzündungen auszulösen und weitere phagozytierende Zellen, insbesondere Neutrophile und Monozyten, zu aktivieren und in das infizierte Gewebe zu locken (Aderem und Ulevitch, 2000). Bei unreifen DCs wirken die Aktivierung der PRRs und die Aufnahme des Pathogens als sogenanntes *Danger*-Signal. Dieses Signal aktiviert die Zellen und führt ebenfalls zur Ausschüttung inflammatorischer Zytokine sowie zur Expression kostimulatorischer Moleküle, und bildet eine elementare Grundlage für die Induktion der adaptiven Immunreaktion (Medzhitov *et al.*, 1997).

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Werden Pathogene durch die Mechanismen des angeborenen Immunsystems nicht vollständig beseitigt, bzw. wird die Antigenlast im Körper zu hoch, wird zusätzlich das adaptive Immunsystem aktiviert. Dieses besteht aus T- und B-Lymphozyten und zeichnet sich, im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem, durch Antigenpezifität und die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses aus. Diese Eigenschaften ermöglichen die spezifische und schnelle Bekämpfung bei einer Reinfektion (Dutton *et al.*, 1998).

Antigenpezifität und Immuntoleranz

Sowohl T- als auch B-Lymphozyten entstehen aus lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark, wobei nur B-Lymphozyten dort auch reifen. T-Lymphozyten hingegen reifen im Thymus. Während die Zellen des angeborenen Immunsystems eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren mit Spezifitäten für verschiedene konservierte Oberflächenmoleküle von

Pathogenen tragen, weist jeder T- und B-Lymphozyt einen einzigen Rezeptortyp von einmaliger Spezifität auf. Diese Rezeptorspezifität entsteht durch somatische (VDJ-; *variable, diverse, joining*) Rekombination der verschiedenen Gensegmente, die den variablen Teil des Rezeptors kodieren (Alt *et al.*, 1992; Tonegawa, 1983). Durch diese zufälligen Gen-Rearrangements entsteht einerseits ein großes Repertoire unterschiedlicher hochspezifischer Rezeptoren gegen Fremdantigene, andererseits bilden sich jedoch auch Rezeptoren, die in der Lage sind, Fragmente körpereigener Proteine zu binden. Aus diesem Grund existieren Mechanismen, die die Toleranz gegenüber solchen autoreaktiven Zellen sicherstellen. Während der Reifung der Lymphozyten im Thymus resultiert der Prozess der negativen Selektion in der Deletion potenziell autoreaktiver T-Lymphozyten (Burnet, 1959). Nur eine geringe Anzahl dieser autoreaktiven Zellen kann dieser Selektion entgehen und in die Körperperipherie gelangen, wo sie durch weitere Mechanismen der peripheren Toleranz reguliert werden (Ratanji *et al.*, 2014). Erkennt eine T-Zelle ein Antigen, ist ihre Aktivierung von weiteren kostimulatorischen Signalen abhängig, was im folgenden Abschnitt näher erläutert wird. Bleiben diese Signale aus, so wechselt die Zelle in einen Zustand der Anergie, welcher sie für ihr Antigen unempfindlich macht (Schwartz *et al.*, 1989; Schwartz, 1997). Darüber hinaus wird die periphere Toleranz durch die Deletion von bereits aktivierten T-Zellen via Apoptose sowie durch regulatorische T-Lymphozyten (T_{reg}) aufrechterhalten, welche in der Lage sind schädliche T-Zell-Aktivierungen zu supprimieren (Abbas *et al.*, 2004).

Die klassische Immunreaktion

Nach vollständiger Reifung gelangen die naiven T- und B-Lymphozyten in den arteriellen Blutkreislauf und werden über diesen bis in die peripheren, sekundären lymphatischen Organe transportiert, in denen letztendlich die adaptiven Immunreaktionen initiiert werden können (Crivellato *et al.*, 2004; Marchesi und Gowans, 1964). Für die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort ist das Zusammenspiel von Lymphozyten mit Zellen des angeborenen Immunsystems entscheidend (Inaba und Steinman, 1985). APCs wie DCs stellen ein Bindeglied zwischen beiden Systemen dar und spielen somit eine entscheidende Rolle bei der Initiation einer klassischen Immunreaktion. Sie erkennen Antigene in der Peripherie, nehmen diese auf und wandern über das lymphatische System in die drainierenden Lymphknoten ein (Inaba *et al.*, 1990). Dort reifen sie und präsentieren Peptidfragmente des phagozytierten, körperfremden Antigens den naiven T-Lymphozyten (Luster, 2002). Voraussetzung für die Erkennung und Bindung des Antigens durch die membrangebundenen, antigenspezifischen T-Zell-Rezeptoren (*T-cell receptors*; TCRs) der T-Lymphozyten ist die sogenannte MHC-Restriktion (Zinkernagel und Doherty, 1974). TCRs erkennen ihre Antigene nur in prozessierter Form und gebunden an ein körpereigenes Protein auf der Oberfläche von APCs. Nach Prozessierung bestehen die Antigene nur noch aus kurzen Aminosäuresequenzen und sind an MHC-Moleküle der Klasse I

oder II gebunden (Germain, 1986; Germain *et al.*, 1996). MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf der Oberfläche nahezu aller kernhaltigen Zellen exprimiert. Die mittels MHC I präsentierten Peptide stammen von endogenen Proteinen aus dem Zytosol oder dem Zellkern (Germain 1986; Pamer und Cresswell, 1998). MHC-Klasse-II-Moleküle hingegen werden nur auf der Oberfläche professioneller APCs, wie DCs oder B-Zellen, exprimiert. Mit Hilfe dieser MHC-Klasse-II-Moleküle werden Peptide internalisierter exogener Antigene präsentiert, die nach der Aufnahme durch z.B. Phagozytose in Endosomen fragmentiert werden (Germain 1986; Watts, 1997). Neben der Aktivierung von naiven T-Lymphozyten sind DCs zudem in der Lage, T-Gedächtniszellen zu aktivieren und damit eine bereits bestehende Immunreaktion zu verstärken (Schlienger *et al.*, 2000).

Die antigenerkennende Struktur der T-Zellen, der TCR, ähnelt einem membrangebundenen Fab-Fragment eines Immunglobulins: er besteht aus zwei Polypeptidketten, die jeweils aus einer konstanten und einer variablen Domäne gebildet werden und durch eine Disulfidbrücke verknüpft sind. Die nebeneinander liegenden variablen Domänen bilden die Antigenbindungsstelle. Des Weiteren ist der TCR mit einem Komplex aus CD3-Molekülen assoziiert, welcher der Stabilisierung und Signaltransduktion bei der Antigenbindung dient (Exley *et al.*, 1991; Janeway, 1992b). Zusätzlich zum TCR benötigen T-Lymphozyten auf ihrer Oberfläche Korezeptoren (CD4 oder CD8), anhand derer sich naive T-Zellen in zwei Hauptgruppen unterteilen lassen: CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Welche Klasse von MHC-Molekülen durch den TCR erkannt werden, ist von diesen Korezeptoren abhängig. MHC-Klasse-I-Moleküle binden an den CD8-Korezeptor. Erfolgt die Antigenpräsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle, wird der CD4-Korezeptor gebunden (Zamoyska, 1998).

Der primäre Kontakt eines naiven T-Lymphozyten mit seinem Antigen wird oft als *Priming* bezeichnet und führt nach erfolgreicher Aktivierung zur Proliferation der antigenspezifischen T-Zellen und zur Differenzierung zu Effektorzellen. Allerdings stimuliert die alleinige Bindung des TCRs an den kompatiblen Peptid-MHC-Komplex auf DCs die naive T-Zelle nicht zur klonalen Expansion und Differenzierung zur Effektorzelle. Die Bindung stellt lediglich das erste von drei nötigen Signalen dar. Das zweite Signal ist für eine optimale Aktivierung und klonale Expansion der antigenspezifischen T-Zellen nötig. Es entsteht durch die Bindung von Rezeptoren auf T-Zellen (CD28) an kostimulatorische Moleküle auf APCs, wie beispielsweise B7-Moleküle (CD80 und CD86) (Greenfield *et al.*, 1998; Linsley und Ledbetter, 1993; Linsley *et al.*, 1991). B7-Moleküle werden nur nach Aktivierung durch ein *Danger*-Signal auf der Oberfläche von APCs exprimiert (Bour-Jordan und Bluestone, 2002; Medzhitov *et al.*, 1997). Bleibt dieses Signal aus, entsteht anstelle einer spezifischen Immunantwort eine transiente Toleranz gegenüber dem Antigen (Anergie) (Schwartz *et al.*, 1989; Schwartz, 1997). Durch diesen Mechanismus wird eine Überaktivierung des adaptiven Immunsystems bei geringer Antigenmenge verhindert. Ein drittes Signal in Form von Zytokinen, welche von APCs sezerniert werden, steuert die

Differenzierung der naiven T-Zellen zu den verschiedenen Typen von T-Effektorzellen, die unterschiedliche Effektormechanismen ausführen. Aus naiven $CD8^+$ T-Lymphozyten entstehen nach ihrer Differenzierung zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T-lymphocytes*; CTLs), wohingegen aus naiven $CD4^+$ T-Zellen Effektorzellen hervorgehen, die sich anhand ihrer sezernierten Zytokine in vier Subpopulationen unterteilen lassen: T_H1 -Zellen, T_H2 -Zellen, T_{reg} -Zellen und T_H17 -Zellen (Stockinger und Veldhoen, 2007). Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin-12 (IL-12) induzieren eine Differenzierung der naiven $CD4^+$ T-Zelle zu T_H1 -Zellen, Interleukin-4 (IL-4) hingegen bringt T_H2 -Zellen hervor (Murphy und Reiner, 2002). Reife T_H1 -Zellen sezernieren wiederum selbst IFN- γ und führen zu einer Aktivierung von Makrophagen der angeborenen Immunität. Reife T_H2 -Zellen aktivieren B-Zellen mit gleicher Antigen-spezifität, welche schließlich proliferieren und sich zu antikörperproduzierenden Plasmazellen differenzieren. Reife T_H2 -Zellen können so eine adaptive humorale Immunantwort induzieren (Abbas *et al.*, 1996; Mosmann und Coffman 1989; Mosmann *et al.*, 1986). T_{reg} -Zellen sind entscheidend für die Inhibierung und Kontrolle einer Immunantwort (Sakaguchi und Sakaguchi, 2005), während T_H17 -Zellen an der Stimulation einer Abwehrreaktion durch neutrophile Granulozyten beteiligt sind (Harrington *et al.*, 2005; Stockinger und Veldhoven, 2007).

Nach dieser Differenzierung löst jedes weitere Zusammentreffen von T-Effektorzellen mit dem spezifischen Antigen Effektorfunktionen aus, ohne dass hierfür eine zusätzliche Kostimulation erforderlich ist. Dies ist vor allem für die Effektorfunktion der B-Zell-Aktivierung von $CD4^+$ T-Helferzellen entscheidend. Nach Aufnahme des Antigens über die B-Zell-Rezeptoren (*B-cell receptors*; BCRs) der B-Lymphozyten (rezeptorvermittelte Phagozytose) wird dieses zu Peptiden abgebaut und, an MHC-Klasse-II-Molekülen gebunden, an der B-Zell-Oberfläche präsentiert. Dort kann es von antigenspezifischen T_H -Zellen erkannt werden. Die Aktivierung von B-Lymphozyten erfolgt erst durch diese zusätzliche Bindung aktivierter T_H -Zellen (Vinuesa *et al.*, 2005). Hierzu wandern die aktivierten T_H -Zellen an die Ränder der B-Zell-Follikel im Lymphknoten (Okada *et al.*, 2005). In Folge der Antigenerkennung auf der B-Zelle kommt es zur Expression und Ausschüttung von B-Zell-kostimulierenden Effektormolekülen (z.B. von CD154 (CD40L) und Zytokinen (IL-4, IL-5, IL-6)) durch die T-Effektorzelle. Diese Moleküle führen wiederum zur klonalen Expansion und Reifung der B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen bzw. Gedächtniszellen (DeFranco, 1987). Die von den Plasmazellen sezernierten Antikörper weisen die gleiche Spezifität auf wie die membrangebundenen BCRs und bilden die humorale Abwehr des adaptiven Immunsystems.

Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, bestehen aus zwei leichten und zwei schweren Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, wodurch eine Ypsilon-förmige Struktur entsteht. Die konstante Region des Antikörpers definiert seine Antikörperklasse (Isotyp; IgM, IgA, IgD, IgE, IgG), während die variable Region mit den Antigenbindungsstellen (*complementarity determining regions*; CDRs) seine Antigen-spezifität bestimmt. Die ersten von

B-Zellen produzierten Antikörper sind vom IgM-Typ, wobei bei der Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen ein Klassenwechsel induziert werden kann (Parker, 1993). Die sezernierten Antikörper sind aufgrund ihrer hohen Spezifität und Affinität in der Lage, Antigene (Pathogene, Toxine) durch direkte Bindung zu neutralisieren bzw. zu inaktivieren und so einen Effekt auf körpereigene Zellen zu verhindern (Brandtzaeg, 2003). Eine weitere Funktion ist die Opsonisierung, also die Markierung eines Erregers mit Antikörpern, welche eine effektivere Fc-Rezeptor-vermittelte Phagozytose durch Makrophagen oder Neutrophile der unspezifischen Abwehr ermöglicht (Ravetch und Kinet, 1991). Die Bindung von Antikörpern an die Oberfläche eines Erregers kann zudem zur Aktivierung des Komplementsystems sowie zur Rekrutierung von NK-Zellen (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*; ADCC) und folglich zur Lyse der Pathogene führen (Cooper, 1985; Cooper und Nemerow, 1985). Somit sind Immunglobuline maßgeblich an der Immunantwort beteiligt und sorgen dafür, dass Fremdartigene letztendlich durch das unspezifische Immunsystem identifiziert und eliminiert werden können.

Während aktivierte T-Zellen den Lymphknoten wieder verlassen, verbleiben Plasmazellen im Lymphknoten. Lediglich ihre sezernierten Antikörper werden über die Lymphe im Körper verteilt (Primärantwort). Nach Beendigung der Immunantwort kommt es zur Apoptose fast aller spezifischen Effektor-Lymphozyten. Lediglich sogenannte Gedächtniszellen bleiben erhalten. Bei wiederholtem Antigenkontakt sind diese Zellen in der Lage, ohne weitere Kostimulation schneller spezifisch und effizient mit einer Generierung von Effektorzellen zu reagieren (Sekundärantwort) (Berek und Milstein, 1987; Dutton *et al.*, 1998; Rogers *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1970).

Auf diese Weise ist der Körper mit seinem angeborenen und adaptiven Immunsystem gut ausgerüstet, um eingedrungene körperfremde Substanzen, Pathogene oder entartete körpereigene Zellen als solche zu identifizieren, auf diese zu reagieren und sie zu bekämpfen. Jedoch kann es im Rahmen der Immunantwort auch zu Fehlsteuerungen wie überschießende Effektorfunktionen kommen, die diesen streng regulierten Ablauf einer Immunreaktion durcheinander bringen. Aus diesem Grund ist es wichtig, durch externe Einflüsse induzierte Reaktionen des Immunsystems frühzeitig zu identifizieren.

1.2 Biologika

Eine zunehmende Anzahl biotechnologisch hergestellter therapeutischer Substanzen basiert heutzutage auf biologischen Molekülen. Solche Produkte, deren aktive Substanz von einer biologischen Quelle produziert oder von dieser extrahiert wird, werden als Biopharmazeutika oder Biologika bezeichnet (Giezen *et al.*, 2008). Hierzu zählen unter anderem monoklonale Antikörper (mAk), Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone und therapeutische Enzyme (Scherer *et al.*, 2010). Basierend auf ihrer pharmakologischen Wirkung und therapeutischen Anwendung wurden Biologika nach Leader *et al.* in solche mit enzymatischer oder regulatorischer Aktivität (rekombinante Proteine, Zytokine), Biologika mit spezifischer Targetaktivität (mAk), Vakzine sowie diagnostische Biologika unterteilt (Leader *et al.*, 2008).

Als erstes rekombinantes Biotechnologieprodukt wurde 1978 rekombinantes Humaninsulin (Humulin®, Eli Lilly) entwickelt, welches 1982 von der *Food and Drug Administration* (FDA) in den USA zugelassen wurde (Bliss, 1993; Chance und Frank, 1993; Ladisch und Kohlmann, 1992). Ein weiterer Meilenstein im Einsatz von Biologika war 1985 die Markteinführung des ersten murinen mAks (Muromonab; OKT3®) durch die FDA zur Behandlung von akuten Abstoßungsreaktionen nach allogener Nieren-, Herz- und Lebertransplantation (Smith, 1996). In den Folgejahren nahmen Biologika immer weiter an Bedeutung zu und der biopharmazeutische Markt stieg infolgedessen von 1993 bis 2016 diskontinuierlich an (Abb. 1). So wurden im Jahr 2016 insgesamt 22 Arzneimittel mit neuem Wirkstoff durch die FDA zugelassen, wovon Biologika erstmals einen Anteil von über 30 % ausmachten (Mullard, 2017). Hier ist zu beachten, dass die regulatorischen Verantwortlichkeiten der FDA für Biopharmazeutika sowohl über das *Center for Drug Evaluation and Research* (CDER) als auch das *Center for Biologics Evaluation and Research* (CBER) ausgeführt werden und sich die hier verwendeten Daten nur auf die Zulassungen über das CDER beziehen.

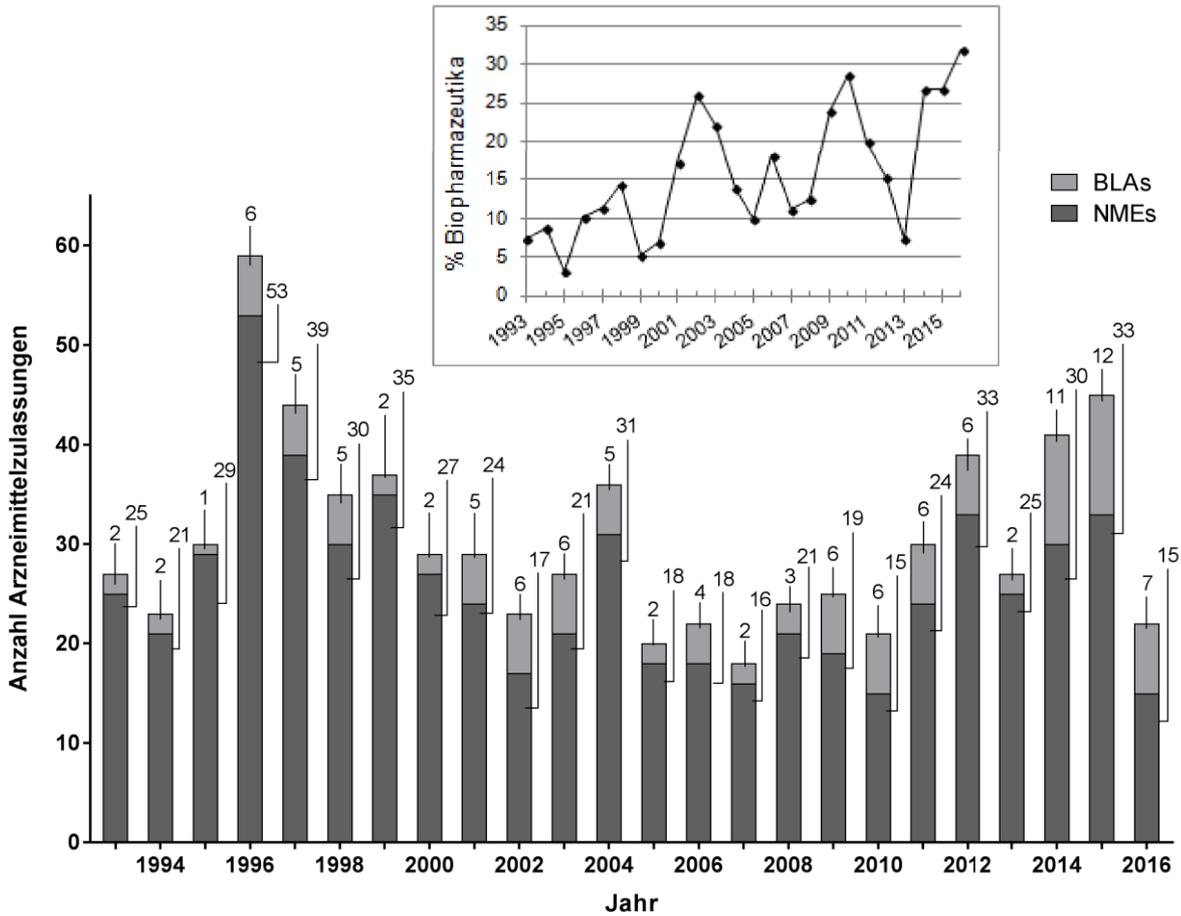


Abbildung 1: Entwicklung des biopharmazeutischen Marktes - Neue FDA Zulassungen von 1993 bis 2016. Das Balkendiagramm zeigt die Anzahl der, seit 1993, jährlich zugelassenen Biopharmazeutika (*biologics licence applications*; BLAs) im Vergleich zu klassischen Arzneimitteln mit neuem Wirkstoff (*new molecular entities*; NMEs). Das Liniendiagramm stellt den prozentualen Anteil jährlich zugelassener BLAs am gesamten Pharmamarkt dar. Der Gesamtpharmamarkt ergibt sich aus der Summe der BLAs und NMEs. Die Daten basieren auf den Zulassungen durch das *Center for Drug Evaluation and Research* (CDER) der FDA (modifiziert nach Mullard, 2017).

Die therapeutischen Indikationen, für die Biologika ihre ursprüngliche Zulassung (FDA, USA) im Zeitraum von 1982 bis 2013 erhalten haben, lassen sich in sechs Kategorien gliedern (Abb. 2A). Die häufigsten Anwendungsbereiche sind die Onkologie (30 %) sowie Autoimmun- und inflammatorische Erkrankungen (29 %), gefolgt von metabolischen, kardiovaskulären und infektiösen Erkrankungen. Zusätzlich lassen sich Biologika auf Basis ihrer Wirkungsweise bzw. ihrer Zielmoleküle unterscheiden (Abb. 2B). Frühe zugelassene Biologika hatten ihre Zielmoleküle direkt auf der Zelloberfläche. Erst Anfang der 1990er kamen sezernierte (lösliche) Proteine, wie beispielsweise Zytokine, und endogene Proteine als mögliches Target hinzu (Kinch, 2015). Mittlerweile wirken rund zwei Drittel der Biologika an löslichen Zielmolekülen (Zytokine, Wachstumsfaktoren, sezernierte Enzyme), wobei Zytokine das Haupttarget von biopharmazeutischen Produkten darstellen.

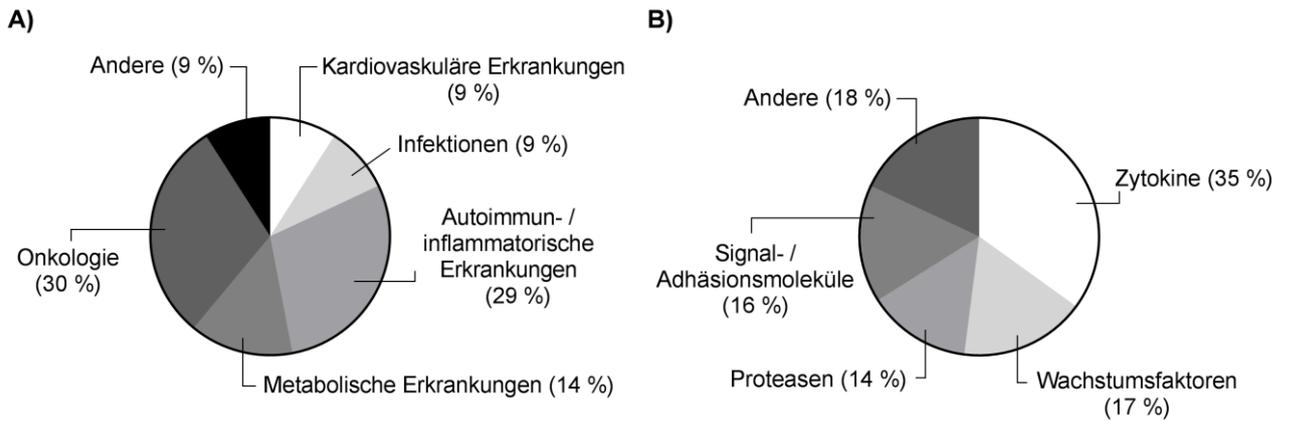


Abbildung 2: Bereiche therapeutischer Indikationen und Zielmoleküle zugelassener Biopharmazeutika (1982 bis 2013). A) Therapeutische Indikationen für die Biologika ihre initiale Zulassung erhalten haben verteilen sich auf sechs Therapiegebiete. B) Zielmoleküle von zugelassenen Biologika. Die Daten beziehen sich auf den Zulassungszeitraum von 1982 bis 2013 in den USA (modifiziert nach Kinch, 2015).

1.2.1 Adverse Effekte von Biologika: Das Problem der Immunogenität

Die Entwicklung von biotechnologisch hergestellten Arzneimitteln und deren klinische Anwendung revolutionierte die moderne Medizin und eröffnete neue zielgerichtete und effektivere Behandlungsmöglichkeiten. Dazu gehören eine Vielzahl schwerer, komplexer Krankheiten wie beispielsweise Multiple Sklerose, Morbus Crohn, rheumatoide Arthritis, Hämophilie A, Diabetes und einige Krebsarten (Schellekens, 2008). Neben den therapeutischen Wirkungen können diese beim Patienten jedoch auch unerwünschte Immunreaktionen auslösen (Schellekens, 2009). Die Fähigkeit einer Substanz, eine Immunreaktion auszulösen wird als Immunogenität bezeichnet (Ratanji *et al.*, 2014). Solche unerwünschten Arzneimittelnebenwirkungen (*adverse drug reactions*; ADRs) werden auf unterschiedlichste Weise gruppiert und klassifiziert (Baldo, 2013; Descotes, 2009; Sethu *et al.*, 2012). Diese adversen immunologischen Effekte umfassen sowohl Immunsuppression als auch Immunstimulation (Tab. 1).

Tabelle 1: Kategorisierung immuntoxischer Effekte von Biopharmazeutika und damit assoziierte adverse klinische Konsequenzen (modifiziert nach Descotes, 2009; Sethu *et al.*, 2012).

Immunsuppression	Immunstimulation
Erhöhte Anfälligkeit für infektiöse Komplikationen	Akute Reaktionen verbunden mit Zytokinfreisetzung (<i>Flu-like</i> Reaktionen, <i>Cytokine Release Syndrom</i>)
Virus-induzierte Neoplasie (Tumor-Neogenese)	Produktion von <i>Anti-Drug</i> -Antikörpern (<i>anti-drug antibodies</i> ; ADAs) → Neutralisierung

Immunsuppression	Immunstimulation
	→ Hypersensitivität (Anaphylaxie, Immunkomplex- vermittelte Reaktionen) → Kreuzreaktivität Autoimmunreaktionen

Durch Biopharmazeutika induzierte ADRs können sowohl immunsuppressiver als auch immunstimulativer Natur sein. Auch wenn immunsuppressive Effekte schwere klinische Konsequenzen wie ein erhöhtes Infektions- oder Krebsrisiko mit sich ziehen, stehen ADRs, die auf eine Immunstimulation zurückzuführen sind, bei der Anwendung von Biopharmazeutika im Vordergrund. Diese ADRs können sowohl in antigenspezifischer als auch in antigenunspezifischer Form auftreten. Zu den antigenspezifischen Reaktionen zählen Autoimmunitätsreaktionen sowie die Produktion von antigenspezifischen Antikörpern gegen den Wirkstoff (*Anti-Drug*-Antikörper; *anti-drug antibodies*; ADAs) während der Therapie. Eine ADA-Produktion kann die therapeutische Wirkung bis hin zu einer Neutralisierung beeinflussen (Jacquemin und Saint-Remy, 1998; Sethu *et al.*, 2012) oder die Induktion von Hypersensitivitätsreaktionen (Baldo, 2013) nach sich ziehen. Darüber hinaus können neutralisierende ADAs nicht nur zum Wirksamkeitsverlust des therapeutischen Proteins führen, sondern auch mit dem körpereigenen, nativen Protein kreuzreagieren und somit die Toxikologie eines Wirkstoffes verändern. Werden endogene Proteine mit wichtigen physiologischen Funktionen neutralisiert, kann dies zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen. Ein Beispiel hierfür ist das in den Jahren 1998 bis 2000 vermehrte Auftreten einer isolierten aplastischen Anämie (*Pure Red Cell Aplasia*; PRCA), deren Ursache Kreuzreaktionen von inhibitorischen Antikörpern gegen rekombinantes Erythropoetin (EPO) mit dem körpereigenen Protein waren (Casadevall *et al.*, 2002; McKoy *et al.*, 2008). Dennoch ist der Anteil an Patienten, bei denen eine solche ADA-Produktion zu den genannten unerwünschten immunologischen Reaktionen führt, eher gering (Casadevall *et al.*, 2002).

Zu den antigenunspezifischen Reaktionen zählen akute, mit Zytokinfreisetzung verbundene Reaktionen, wie das *Cytokine Release Syndrom* (CRS). Die Thematiken des CRS sowie der Produktion von ADAs werden im Zusammenhang mit der Immunogenität von therapeutischen mAk vertieft (Kap. 1.2.3.2).

Mit zunehmender Entwicklung von biotechnologisch hergestellten Arzneimitteln und aufgrund der hier beschriebenen Immunogenität solcher Biologika im Vergleich zu klassischen Arzneimitteln (*small molecules*; *low molecular weight drugs*), wurde für diese Substanzklasse schließlich eine eigene Richtlinie entwickelt. Die ICH-Richtlinie S6 (*Preclinical Safety Evaluation*

of *Biotechnology-Derived Pharmaceuticals*) war somit die erste Richtlinie, die die Notwendigkeit einer immuntoxikologischen Evaluierung von Biologika adressierte.

Bereits die ICH-Richtlinie S8 (*Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals*) für die Evaluierung immuntoxischer Eigenschaften von *small molecules* verlangte eine umfangreiche Berücksichtigung immunogener Eigenschaften von Wirkstoffen in der präklinischen Phase. Obwohl diese sowohl potenzielle Immunstimulationen als auch Immunsuppressionen berücksichtigte, lag der Schwerpunkt jedoch auf der Immunsuppression. Bei Biologika hingegen steht eine Überaktivierung deutlich stärker im Vordergrund als bei klassischen Arzneimitteln, sodass die ICH S6 den Schwerpunkt auf eine Evaluierung der Immunstimulation verlagerte. Allerdings legt die ICH S6 kein definiertes Vorgehen fest, sondern gibt lediglich Rahmenbedingungen vor und verweist auf ein *case-by-case* Vorgehen (Brennan *et al.*, 2004). So ist für jedes Biopharmazeutikum eine spezifische, wissenschaftlich begründete Prüfstrategie für die präklinischen Studien zu entwickeln. Zusätzlich wird betont, dass trotz allem die klassischen Immuntoxizitätsstudien bei der Testung von Biologika nicht vernachlässigt werden dürfen.

1.2.2 Induktion immunogener Reaktionen

Diverse Faktoren können an der Entstehung unerwünschter immunologischer Reaktionen beteiligt sein bzw. diese begünstigen, jedoch sind bis heute nicht alle dieser Faktoren bekannt. Eine der Schwierigkeiten bei der Entwicklung von Biologika ist daher die Vorhersage, ob und in welchem Ausmaß ein Biopharmazeutikum im Menschen immunogen wirkt.

Das Problem der Immunogenität wurde bereits früh erkannt, als aufgereinigte Proteine tierischen Ursprungs, wie beispielsweise Rinder- oder Schweineinsulin, für den therapeutischen Einsatz im Menschen angewandt wurden. Hier war die Hauptursache induzierter Immunogenität, die xenogene Herkunft der Substanz, klar zu identifizieren (Chance *et al.*, 1976; Schernthaner, 1993). Später stellte sich jedoch heraus, dass auch Produkte, welche aus humanem Gewebe oder Serum aufgearbeitet wurden, wie beispielsweise Faktor VIII, klinische Konsequenzen hatten und immunologische Reaktionen auslösten. Diese Produkte wurden Patienten mit angeborenen Defizienzen als Substitution fehlender endogener Proteine verabreicht. Eine fehlende immunologische Selbsttoleranz gegenüber dem endogenen Protein stellte die Ursache der induzierten Immunreaktionen dar (Jacquemin und Saint-Remy, 1998). Die folgende Einführung der rekombinanten DNA-Technologie ermöglichte es schließlich Produkte herzustellen, welche homolog oder nahezu identisch zum jeweiligen nativen humanen Protein waren. Das Problem der Immunogenität blieb jedoch bestehen, wenn auch in geringerem Ausmaß (Jakobovits *et al.*, 2007; Weiner, 2006). Hieraus wird deutlich, dass es über den fremdartigen Ursprung hinaus weitere Faktoren geben muss, die die Immunogenität von Biologika beeinflussen. Diese werden meist in zwei Kategorien unterteilt: produkt- und

patientenabhängige Faktoren (Mukovozov *et al.*, 2008; Tovey *et al.*, 2011). Oft werden behandlungsabhängige Faktoren als eine weitere Kategorie aufgeführt (Schellekens, 2002b; van Beers und Bardor, 2012; Tab. 2).

Tabelle 2: Faktoren zur Begünstigung immunogener Reaktionen auf Biologika.

Produktspezifisch	Patientenspezifisch	Behandlungsspezifisch
Target & biologische Aktivität	Krankheitsbild (Immunstatus, Begleitmedikation)	Applikationsroute
Aminosäuresequenzunterschiede zwischen nativem und therapeutischem Protein (Grad der Humanisierung)	Alter	Dosis
Proteinmodifikationen – Oxidation, Desaminierung, Glykosylierung	Geschlecht	Behandlungsdauer und -frequenz
Proteinaggregation	Genetische Prädisposition – Gendefekte (→ Fehlen endogener Proteine), HLA-Typ	
Formulierung des Wirkstoffes		
Verpackungsmaterial, Lagerungsbedingungen		
Kontaminanten / Verunreinigungen (Adjuvantien)		

Produktspezifische Faktoren

Der wesentliche extrinsische Faktor, der die Immunogenität von Biologika beeinflusst, ist ihre molekulare Struktur und die damit einhergehenden Bereitstellung antigener Epitope (Singh, 2011). Die Xenogenität, also die Abweichung des biopharmazeutischen Produkts von seinem natürlichen endogenen Homolog, ist ein wichtiger Faktor dafür, ob das humane Immunsystem eine Substanz als körpereigen oder körperfremd erkennt. Sie hängt von den Unterschieden in der Aminosäuresequenz (Sequenzvariation) und posttranslationalen Modifikationen wie z.B. dem Glykosylierungsmuster ab. Hierbei muss nicht immer die prozentuale Homologie entscheidend sein. Auch wenige Veränderungen in bestimmten Aminosäuresequenzen können bereits das immunogene Potenzial beeinflussen. Jedoch sind der Ursprung und die Unterschiede zur humanen Aminosäuresequenz allein nicht immer ausschlaggebend. Auch rekombinant hergestellte Biopharmazeutika mit komplett identischen Sequenzen zeigten bereits in der Vergangenheit immunogene Eigenschaften (Beispiel Erythropoetin: Prabhakar und Muhlfelder, 1997). Im Gegensatz dazu existieren auch Beispiele von Biopharmazeutika, die sich zwar von der natürlichen Sequenz unterscheiden, bei denen diese Sequenzunterschiede jedoch nicht zu einer erhöhten Immunogenität führten (Beispiel IFN- α 2A: Kontsek *et al.*, 1999).

Über die Xenogenität hinaus spielen zudem chemische Proteinmodifikationen, wie Oxidation oder Desaminierung, bei der Antigenaufnahme durch APCs eine Rolle (Schellekens, 2002b; Sethu *et al.*, 2012). So können die durch diese Degradation entstandenen Produkte eine Antigenaufnahme durch APCs steigern und die Entstehung einer Immunreaktion fördern. Auch Produkteigenschaften wie die Proteinstruktur sind von Bedeutung und können die Immunogenität eines Wirkstoffes erhöhen. Ein besonders relevanter Faktor ist hier die Proteinaggregation (Hermeling *et al.*, 2004; Schellekens, 2002a). Da Immunogenität prinzipiell von der Anordnung und Präsentation antigener Epitope abhängig ist, kann bereits eine unnatürliche Präsentation eines Antigens, wie im Fall einer Aggregation, eine Immunreaktion auslösen oder steigern (van Beers und Bardor, 2012). Aggregierte Proteine weisen, wie auch Pathogene, eine Vielzahl an repetitiv angeordneten Epitopen auf, worauf das Immunsystem auf unterschiedliche Weise reagieren kann. Zunächst können diese multiplen Epitope und/oder die Konformationsänderungen in Aggregaten eine klassische Immunreaktion induzieren, indem sie die Antigenaufnahme durch APCs, deren Aktivierung und folglich eine T-Zell-abhängige Immunreaktion steigern (De Groot und Scott, 2007; Jones *et al.*, 2011; Sethu *et al.*, 2012). Darüber hinaus können Aggregate B-Zellen auch direkt stimulieren. Die Präsentation einer solchen Anordnung vieler gleicher Epitope kann zur Kreuzvernetzung multipler BCRs führen (Rosenberg, 2006), welche wiederum eine B-Zell-Proliferation und Antikörperproduktion mit sich ziehen kann (Sauerborn *et al.*, 2010). Aggregate können somit sowohl T-Zell-abhängige als auch T-Zell-unabhängige Immunreaktionen auslösen (De Groot und Scott, 2007). Beide Szenarien resultieren hierbei in einer potenteren immunogenen Reaktion auf das aggregierte Protein, im Vergleich zur monomeren Version. Zudem können Aggregate als *Danger*-Signal fungieren und so über die Aktivierung des angeborenen Immunsystems eine unspezifische inflammatorische Reaktion induzieren.

Des Weiteren können die Formulierung des Wirkstoffes (z.B. Stabilisatoren), Verpackungsmaterialien, Lagerungsbedingungen (insbesondere hohe Lagerungstemperaturen oder Lichtexposition) oder der Herstellungsprozess als solcher (z.B. Scherkräfte) zur Entstehung ungewollter Proteinmodifikationen beitragen (Mukovozov *et al.*, 2008; Schellekens, 2002b). Daher ist der Proteinstabilität bei der Herstellung besonders viel Sorgfalt entgegen zu bringen (Cleland *et al.*, 1993).

Weitere produktbedingte Faktoren stellen Kontaminanten durch die Produktionszelllinie und prozessbedingte Verunreinigungen dar, welche als *Danger*-Signal agieren (Wilson *et al.*, 1985). Diese Signale haben eine erhöhte Expression kostimulatorischer Moleküle auf APCs zur Folge, die wiederum eine effizientere Prozessierung und Präsentation des Antigens bewirkt und somit das Risiko einer potenziellen Immunogenität eines Wirkstoffes steigert.

Patientenspezifische Faktoren

Bei der Entstehung von Immunogenität ist der Einfluss patientenspezifischer, intrinsischer Eigenschaften nicht zu vernachlässigen. Auf Seiten des Patienten können Krankheitsbild, Begleitmedikation, Alter, Geschlecht und genetische Prädispositionen Risikofaktoren darstellen. So ist es weniger wahrscheinlicher, dass bei Patienten mit beeinträchtigtem Immunsystem, wie beispielsweise Krebspatienten, eine Immunreaktion auftritt als bei solchen mit intaktem Immunsystem (Antonelli, 1997). Auch krankheitsassoziierte Infektionen oder Traumata können zur Entstehung einer potenteren immunogenen Reaktion beitragen, indem inflammatorische Zytokine oder reaktive Sauerstoffspezies als *Danger*-Signale fungieren und die Expression kostimulatorischer Moleküle auf APCs begünstigen (Rutault *et al.*, 1999). Ein weiterer patientenspezifischer Faktor, der zu einer veränderten Expression dieser kostimulatorischen Moleküle und einer veränderten Funktion der APCs führen kann, ist das Alter des Patienten. So kann das Ausmaß immunogener Reaktionen auf ein therapeutisches Protein mit dem Alter variieren (Pereira *et al.*, 2011; Rafi *et al.*, 2003). Bei der genetischen Prädisposition wiederum spielen mögliche Gendefekte eine entscheidende Rolle. Patienten mit Defizienzen für ein endogenes Protein fehlt die immunologische Selbsttoleranz für dieses, wodurch sie im Rahmen einer Substitutionstherapie anfälliger für die Induktion einer Immunreaktion sind (Prescott *et al.*, 1997). Auch genetische Polymorphismen wie der individuelle HLA-Haplotyp können die Immunogenität des therapeutischen Proteins beeinflussen. So haben manche MHCs eine höhere Affinität für bestimmte antigene Peptide von Biologika als andere und sind in der Lage, stabilere Peptid-MHC II-Komplexe zu bilden (Lazarski *et al.*, 2005; Sethu *et al.*, 2012). Die Qualität dieses Komplexes, also die Kombination aus HLA-Typ und kompatibelem antigenem Peptid, bestimmt folglich die Qualität der Antigenpräsentation durch APCs und das Potenzial zur Induktion einer immunogenen Reaktion.

Behandlungsspezifische Faktoren

Auch behandlungsspezifische Faktoren können die Entstehung von immunogenen Reaktionen beeinflussen. Hier sind vor allem die Applikationsroute, die Dosis sowie die Behandlungsdauer und -frequenz zu nennen. Im Vergleich zu anderen Applikationsrouten induziert eine subkutane Applikation am häufigsten immunogene Reaktionen (Peng *et al.*, 2009; Ross *et al.*, 2000; Sethu *et al.*, 2012). Dies wird darauf zurückgeführt, dass in subkutanem Gewebe besonders viele DCs vorkommen, wodurch Antigene schneller aufgenommen, prozessiert und den T-Lymphozyten präsentiert werden können. Eine intravenöse Applikation hingegen ist am wenigsten mit Immunogenität assoziiert, weshalb diese die bevorzugte Route zur Verabreichung eines Therapeutikums darstellt (Ross *et al.*, 2000). Bei Dosis und Behandlungsdauer zeigte sich, dass die Auswirkungen der Behandlungsdauer auf eine induzierte Immunogenität unabhängig von der Dosis sind (Ross *et al.*, 2000). Prinzipiell gilt aber, dass sowohl eine erhöhte Dauer bzw.

Frequenz der Behandlung als auch eine erhöhte Dosis eine gesteigerte Antigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation und folglich die Entstehung von ADAs im weiteren Verlauf der Immunreaktion begünstigt (Sethu *et al.*, 2012). Hier kommt jedoch der Behandlungsdauer und -frequenz eine besondere Bedeutung zu, da eine wiederholte Administration eines Selbstantigens zur Überwindung der Immuntoleranz führen kann (Sethu *et al.*, 2012).

Es lässt sich zusammenfassen, dass die meisten dieser Faktoren vor allem Einfluss auf die Antigenprozessierung und -präsentation durch professionelle APCs haben, welche Schlüsselereignisse in der Entstehung von Immunogenität sind (Abb. 3).

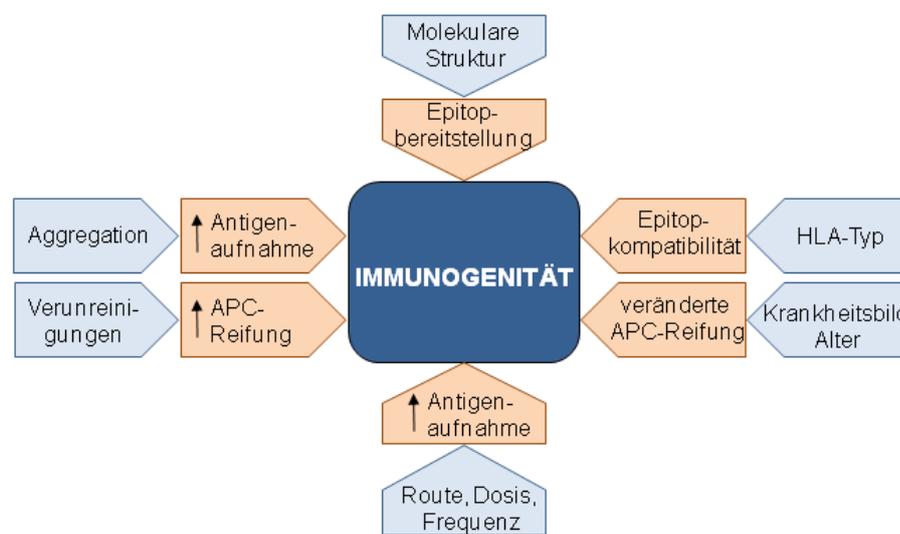


Abbildung 3: Einfluss diverser Faktoren auf die Antigenprozessierung und -präsentation von APCs. Eine Reihe produkt-, patienten- und behandlungsspezifischer Faktoren sind mit der Induktion von Immunogenität durch Biologika assoziiert. Diese Faktoren üben ihren Einfluss über die Modulation der Antigenprozessierung und -präsentation durch APCs aus, indem sie ihre Antigenaufnahme, die Expression kostimulatorischer Moleküle, den Reifungsstatus und die Bereitstellung immunogener Epitope beeinflussen (modifiziert nach Sethu *et al.*, 2012).

Wie unvorhersehbar das Problem der Immunogenität ist, zeigt das Beispiel des rekombinanten EPOs, welches bereits seit 1988 einer Vielzahl von Patienten verabreicht wurde (McKoy *et al.*, 2008). Während in den ersten zehn Jahren seines Einsatzes die Produktion EPO-induzierter neutralisierender Antikörper eher selten war, stieg die Anzahl der Patienten, bei denen es zur Produktion dieser Antikörper kam seit 1998 drastisch an (Casadevall *et al.*, 2002). Es existieren verschiedene Hypothesen, welche Faktoren zu dieser erhöhten Inzidenz geführt haben könnten, die genaue Ursache konnte jedoch nicht identifiziert werden (Boven *et al.*, 2005; Macdougall *et al.*, 2012; Sharma, 2004). Dieser Fall verdeutlicht umso mehr, dass eine Vielzahl diverser Faktoren Einfluss auf die Induktion von ADRs, im Speziellen auf die Generierung von ADAs, nehmen kann, was die Vorhersage der Immunogenität von Biopharmazeutika beim Menschen sowie die Identifizierung einzelner Ursache erschwert.

1.2.3 Therapeutische monoklonale Antikörper

Die Entwicklung der Hybridomtechnologie durch Köhler und Milstein im Jahr 1975 ermöglichte die Herstellung von mAk und deren Einsatz in Forschung, Diagnostik und Therapie (Köhler und Milstein, 1975). Hierbei werden antikörperproduzierende B-Zellen mit murinen Myelomzellen fusioniert, wodurch Hybridomzellen entstehen, die unbegrenzt IgG-Antikörper einer einzigen, bekannten Spezifität produzieren. 1985 wurde der erste mAk, Muromonab (OKT3), zur Therapie akuter Transplantationsabstoßungen zugelassen (Smith, 1996). Da murine Antikörper im menschlichen Organismus jedoch *per se* als Xenoantigen wirken, können sie klassische Immunreaktionen auslösen und eine hohe Inzidenz an Nebenwirkungen mit sich ziehen. Somit lag der Fokus bei der Weiterentwicklung in der Herstellung gentechnisch modifizierter mAk mit reduzierter Immunogenität. Hierfür, und um die Wirksamkeit (Halbwertszeit und Bindungsaffinität) zu optimieren, wurden zunächst chimäre (-ximab), später humanisierte (-zumab) und humane (-umab) Antikörper entwickelt (Abb. 4). Bei chimären Antikörpern besteht lediglich die variable Region der antigenbindenden Fragmente (Fab-Fragmente, *fragment antigen binding*) aus Mausprotein, die konstante Region des Immunglobulins hingegen besteht aus humanen Peptidsequenzen. Bei humanisierten Antikörpern wurde der Mausanteil auf die hypervariablen Regionen, welche für die Antigenerkennung elementar sind (*complementarity determining regions*; CDRs), reduziert. Humane Antikörper bestehen ausschließlich aus humanen Peptidsequenzen. Eine weitere Technik zur Herstellung von, insbesondere humanen, mAk stellen Phagen-Display-Bibliotheken dar.

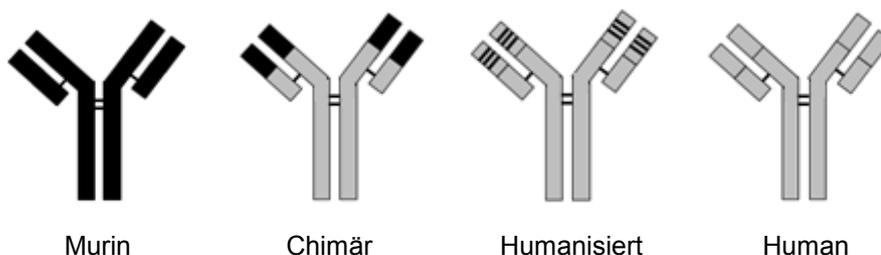


Abbildung 4: Gentechnisch modifizierte monoklonale Antikörper für die therapeutische Anwendung. Der Mausanteil der einzelnen Antikörper wurde mit zunehmender Modifizierung reduziert. Bei chimären mAk bestehen die variablen Regionen aus murinem Protein, während bei humanisierten Antikörpern nur noch die hypervariablen Regionen (CDRs) murinen Ursprungs sind. Auch gänzlich humane mAk werden mittlerweile zur therapeutischen Anwendung hergestellt.

Mit der Entwicklung der ersten chimären Antikörper nahm die Zulassungsrate von mAk drastisch zu. Den größten Anteil stellen mittlerweile humanisierte Antikörper dar, die wenigsten sind murinen Formates (Elvin *et al.*, 2013; Reichert *et al.*, 2005). Antikörper murinen Ursprungs werden heutzutage überwiegend in der Krebstherapie eingesetzt, da ihre immunogenen

Eigenschaften hier geringere Auswirkungen auf das ohnehin bereits beeinträchtigte Immunsystem des Patienten haben (Elvin *et al.*, 2013).

Während im November 2014 47 mAk in den USA (FDA) oder der EU (EMA) zugelassen waren (Ecker *et al.*, 2015), sind mittlerweile 83 mAk zur Behandlung verschiedenster Erkrankungen klinisch verfügbar (Quelle: FDA Homepage, Stand 26.05.2018). Dabei steigt ihre therapeutische Relevanz aufgrund ihrer enormen Stabilität, Bioverfügbarkeit und Targetspezifität (Brennan *et al.*, 2010; Hansel *et al.*, 2010) kontinuierlich an. Aktuell machen mAk 25 % des gesamten biopharmazeutischen Marktes aus und spielen eine essentielle Rolle beim stetigen Anstieg der Anzahl zugelassener Biopharmazeutika (Buyel *et al.*, 2017; Chung, 2017). Ihr globaler Umsatz machte im Jahr 2013 ungefähr die Hälfte des Umsatzes des gesamten biopharmazeutischen Marktes aus (Ecker *et al.*, 2015). Auch in 2014 waren unter den 20 umsatzstärksten Arzneimitteln letztendlich 11 Biopharmazeutika, einschließlich sechs mAk (Chung, 2017). Die Hauptindikationen der mAk stellen Krebs- und inflammatorische bzw. Autoimmunerkrankungen dar (Brennan *et al.*, 2010; Elvin *et al.*, 2013), wobei die überwiegende Anzahl der mAk Modulatoren von Signal- oder Adhäsionsmolekülen sind (Kinch, 2015). Mögliche Zielstrukturen von mAk sind in der nachfolgenden Tabelle kurz dargestellt (Tab. 3).

Tabelle 3: Targets therapeutischer monoklonaler Antikörper (modifiziert nach Scherer *et al.*, 2010).

Targets therapeutischer monoklonaler Antikörper	Beispiele
Lösliche Mediatoren und Zytokine	Anti-TNF- α (Infliximab, Adalimumab)
Zelloberflächenmoleküle	Anti-CD20 (Rituximab)
IgE-Antikörper	Anti-IgE (Omalizumab)
Tumor-Antigene	Anti-EGFR (Cetuximab) Anti-HER2 (Trastuzumab)

1.2.3.1 Therapeutische Wirkmechanismen

Die Wirkmechanismen von mAk sind sehr unterschiedlich und können sowohl über ihre spezifischen CDRs innerhalb der Fab-Region als auch über ihre Fc-Regionen ausgeübt werden (Abb. 5).

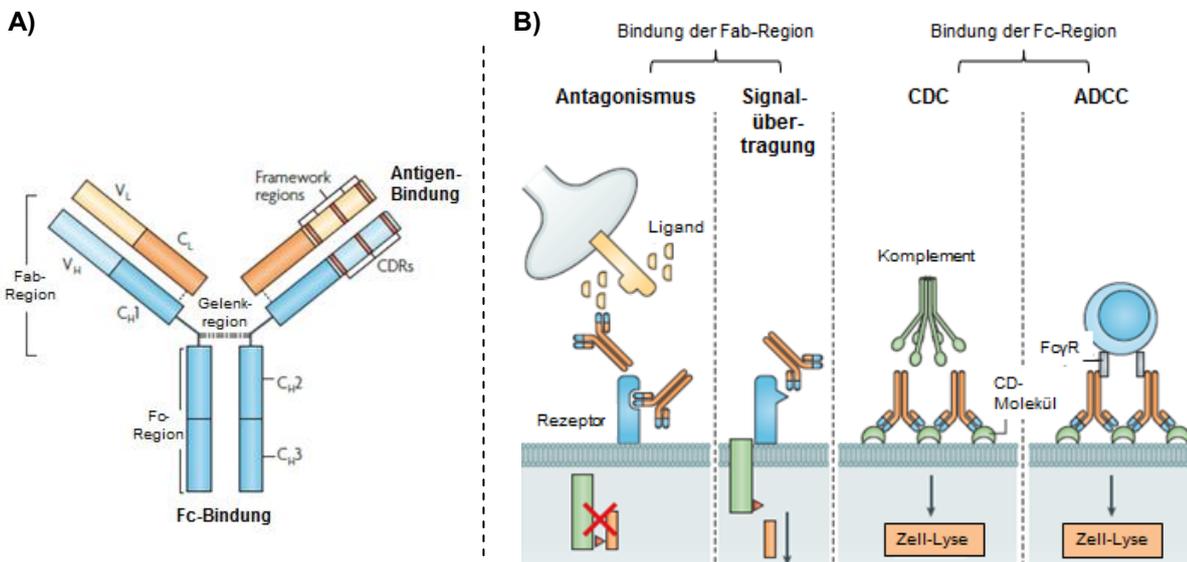


Abbildung 5: Struktur und Wirkmechanismen von monoklonalen Antikörpern. A) Schematische Darstellung eines mAks (IgG). B) Wirkmechanismen von mAk. Die CDRs (hypervariable Domänen) innerhalb der Fab-Region sind für die spezifische Antigenbindung verantwortlich, wodurch entweder Antagonismus oder eine Signalübertragung vermittelt werden kann. Die Fc-Region ist für die Bindung von Komplement oder Fc-Rezeptoren anderer Zellen verantwortlich und kann so zur Zell-Lyse durch CDC bzw. ADCC führen (modifiziert nach Hansel *et al.*, 2010).

Mechanismen, die über die CDRs kontrolliert werden, beinhalten Antagonismus und Signalübertragung (Agonismus). Bestimmte Antikörper binden spezifisch entweder einen Liganden oder Rezeptor eines bestimmten Zelltypen und inhibieren so seine Immunfunktion bzw. eine mögliche Stimulation. Im Gegensatz hierzu können andere Antikörper wiederum durch spezifische Bindung eines Rezeptors, Signaltransduktionen induzieren. Ein mAk kann zudem Funktionen über seine Fc-Regionen ausüben, indem er über seinen antigenbindenden Teil (CDRs) Oberflächenstrukturen seiner spezifische Zielzelle (z.B. Krebszelle) und über seine Fc-Regionen Komplement oder Fc-Rezeptoren einer Effektorzelle bindet. Diese Bindung führt zur Lyse oder Phagozytose der Zielzelle durch die Effektorzelle. Zu den Fc-vermittelten Mechanismen von mAk zählen somit die komplementabhängige Zytotoxizität (*complement-dependent cytotoxicity*; CDC), die antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent-cell-mediated cytotoxicity*; ADCC) und die antikörperabhängige, zelluläre Phagozytose (nicht dargestellt; Hansel *et al.*, 2010).

Trotz ihrer Vorteile bei der Behandlung verschiedenster Erkrankungen können mit ihrer erwünschten pharmakologischen Wirkung auch unerwünschte Nebenwirkungen einhergehen. So wurde ihre klinische Anwendung über die Jahre mit der Entstehung einer Reihe adverser Effekte assoziiert, unter denen solche, die das Immunsystem betreffen, die häufigsten waren (Descotes, 2009).

1.2.3.2 Adverse Effekte monoklonaler Antikörper

Aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften interagieren mAk direkt mit Komponenten des Immunsystems. Ihre so erzielte und gewünschte immunmodulierende Wirkung birgt allerdings auch das Risiko unerwünschter immunvermittelter Reaktionen (Brennan *et al.*, 2010; Descotes, 2009). Die primäre Toxizität und das immunogene Potenzial von mAk hängen oft von einer übermäßigen und anhaltenden Bindung ihres molekularen Targets ab und können durch ihren Wirkmechanismus erklärt werden (Brennan *et al.*, 2010; Scherer *et al.*, 2010). Bereits in Kapitel 1.2.1 werden die möglichen, durch Biologika induzierten, adversen Effekte erläutert. All diese ADRs können auch durch diese Untergruppe von Biologika, den mAk, induziert werden.

Eine immunsuppressive Wirkung von mAk wird sich beispielsweise bei der Prävention von Transplantatabstoßungsreaktionen oder zur Behandlung von Autoimmun- bzw. inflammatorischen Erkrankungen zunutze gemacht. Die meisten klinischen Erfahrungen stehen bei Letzterem in Verbindung mit anti-TNF- α Antikörpern wie beispielsweise Infliximab oder Adalimumab. Diese lindern die klinischen Symptome chronisch-inflammatorischer Erkrankungen durch eine Verringerung eines erhöhten TNF- α Levels. Die chronische Administration anti-inflammatorischer mAk kann bei Patienten jedoch auch ein erhöhtes Infektionsrisiko zur Folge haben, da TNF- α auch bei Abwehrmechanismen gegen Infektionserregern eine zentrale Rolle spielt und die Aktivität verschiedener Immunzellen reguliert (Keane *et al.*, 2001; Rychly und DiPiro, 2005; Strangfeld und Listing, 2006). Obwohl das Auftreten infektiöser Komplikationen eine der häufigsten Nebenwirkungen immunsuppressiver mAk darstellt, sind diese nicht so ernst wie solche nach Behandlung mit primären immunsuppressiven Substanzen, die keine gezielte, sondern eine allgemeine Immunsuppression bewirken (Descotes, 2009).

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt jedoch auf den potenziellen adversen Effekten, die mit einer substanzspezifischen Immunstimulation einhergehen. Hier sind vor allem mit Zytokinfreisetzung verbundene, akute Reaktionen und die Produktion von antigenspezifischen Antikörpern gegen das Therapeutikum (ADAs) zu nennen.

Konsequenzen und Mechanismen des Cytokine Release Syndroms

Akute Reaktionen, die mit einer Zytokinfreisetzung einhergehen, treten in unterschiedlichen Schweregraden auf und reichen von *Flu-like* Reaktionen bis hin zum sogenannten *Cytokine Release Syndrom* (CRS) (Descotes, 2009; Scherer *et al.*, 2010). Da sie primär während oder unmittelbar nach der ersten Administration auftreten und die Reaktionen mit späteren Infusionen nachlassen, werden sie auch als *First-dose* Phänomen bezeichnet (Chung, 2008). Die typischerweise milden bis moderaten *Flu-like* Reaktionen sind durch leichtes Fieber (38 – 39,5 °C), Schüttelfrost, Müdigkeit, Kopfschmerzen und Übelkeit gekennzeichnet (Dillman, 1999). Die Symptome klingen in der Regel nach wenigen Stunden ab. Reaktionen, die auf ein CRS zurückzuführen sind, sind hingegen schwerwiegender. Die klinischen Effekte eines CRS können von Hyperpyrexie (> 40 °C), Herz-Kreislauf-Störungen wie Blutdruckabfall, Tachykardie und Kreislaufkollaps über diverse neurologische Störungen (Tremor, Rigor, Krampfanfälle) bis hin zu multiplem Organversagen führen (Descotes, 2009).

Der diesen Symptomen zugrunde liegende Mechanismus ist eine systemische Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie Zytokine, Chemokine, Sauerstoffradikale und Komplementfaktoren während oder unmittelbar nach der ersten Infusion (Bugelski *et al.*, 2009; Descotes und Vial, 2007). Zytokine wie IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-8 und IL-1 β sind hierbei die primären Initiatoren und werden in Folge einer unkontrollierten Aktivierung von verschiedenen immunkompetenten Zellen wie Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten und NK-Zellen freigesetzt (Bugelski *et al.*, 2009). Diese Aktivierung kann sowohl die eigentliche Effektorzelle (Abb. 6A-C) als auch Nicht-Effektorzellen (Abb. 6D) betreffen. Eine Aktivierung der Effektorzelle kann durch direkte, targetspezifische Bindung des mAKs an diese erfolgen und durch Kreuzvernetzung verstärkt werden. Die Kreuzvernetzung kann entweder mittels bereits vorhandener anti-IgG Antikörper (Bindung des Targets durch Fab-Arme; Abb. 6B) oder durch eine Interaktion der Fc-Region des mAKs mit Fc γ -Rezeptoren (Fc γ Rs) auf Nicht-Effektorzellen (z.B. NK-Zellen, Neutrophile, Makrophagen; Abb. 6C) zustande kommen. Die daraus resultierende Clusterung des antigenen Targets auf der Effektorzelle führt schließlich zu einer erhöhten Stimulation der Zelle, die eine gesteigerte Zytokinfreisetzung zur Folge hat. Eine Kreuzvernetzung dieser FcRs kann aber auch zur Aktivierung und Zytokinfreisetzung durch die Nicht-Effektorzelle führen (Bugelski *et al.*, 2009; Stebbings *et al.*, 2007; Wing, 2008; Abb. 6D). Zudem kann die Bindung mit Fc-vermittelten Effektorfunktionen wie ADCC assoziiert sein und Zytokine über eine Zell-Lyse freisetzen (Beispiel: Rituximab) (Brennan *et al.*, 2010).

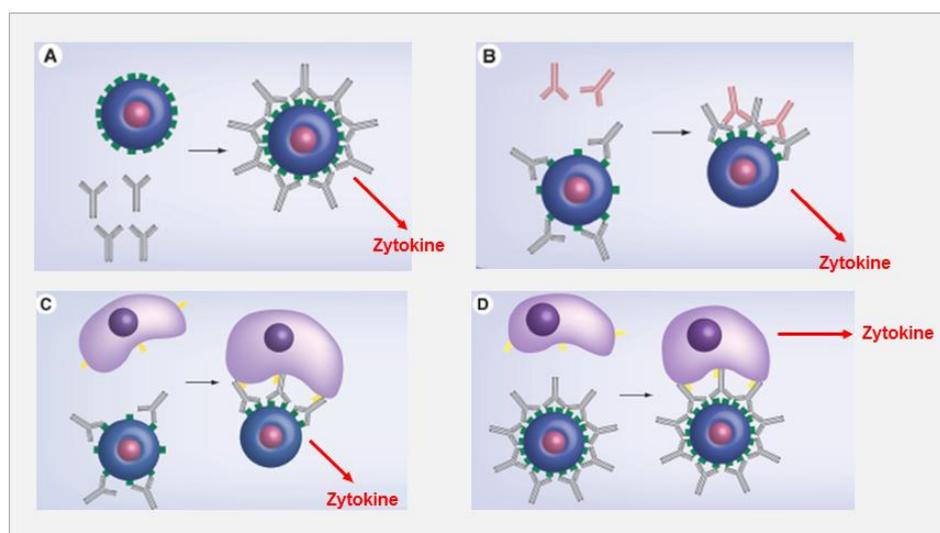


Abbildung 6: Mechanismen zur Induktion eines Cytokine Release Syndroms (CRS). Ein CRS ist das Resultat einer Aktivierung verschiedener Immunzellen, sowohl Effektor- als auch Nicht-Effektorzellen, und wird durch eine Kombination der dargestellten Mechanismen ausgelöst. Die Aktivierung der Effektorzelle kann durch targetspezifische Bindung des mAbs ausgelöst werden (A). Verstärkt wird diese durch Kreuzvernetzung und Clusterung des antigenen Targets durch anti-IgG (B) oder durch Interaktion der Fc-Region mit FcRs auf Nicht-Effektorzellen (C). Eine Kreuzvernetzung der FcRs kann zudem zur Aktivierung und Zytokinfreisetzung durch Nicht-Effektorzellen führen (D) (modifiziert nach Bugelski *et al.*, 2009).

Konsequenzen und Mechanismen einer ADA-Produktion

Ein weiterer adverser Effekt von mAk, der auf eine Immunstimulation zurückzuführen ist, ist die Produktion antigenspezifischer Antikörper gegen den Wirkstoff (ADAs) während der Therapie. Die Inzidenz von Patienten, welche spezifische Antikörper produzieren, die Serumlevel der Antikörper und ihre klinische Relevanz können hierbei extrem variabel sein. Obwohl eine ADA-Produktion bei einer überwiegenden Anzahl Biopharmazeutika keine klinischen Konsequenzen mit sich zieht (Schellekens, 2002b), besteht dennoch die Möglichkeit, dass diese Antikörper schädliche Auswirkungen auf die Pharmakokinetik, Wirksamkeit und Sicherheit des Therapeutikums haben. ADAs sind in der Lage, durch ihre Bindung die Pharmakokinetik des Wirkstoffs zu verändern, indem sie beispielsweise ihre *Clearance* beschleunigen (*clearing antibodies*) oder ihre Bioverfügbarkeit verlängern (*sustaining antibodies*) und somit ihre Wirksamkeit verringern bzw. erhöhen (Gribben *et al.*, 1990; Ponce *et al.*, 2009; Sethu *et al.*, 2012). Ihr Haupteffekt ist jedoch der Wirksamkeitsverlust des Therapeutikums (neutralisierende Antikörper) (Schellekens, 2002b). Welche Effekte zum Tragen kommen ist von den Epitopen auf den therapeutischen Proteinen abhängig, mit denen die ADAs interagieren. Im Gegensatz zu Antikörpern, die zu einer beschleunigten *Clearance* oder verlängerter Bioverfügbarkeit führen, binden neutralisierende Antikörper an Epitope des therapeutischen Proteins, die für eine Liganden-Rezeptor-Interaktion mit seinem vorgesehenen Zielmolekül relevant sind. Dadurch inhibieren die neutralisierenden Antikörper diese Interaktion und folglich auch ihre therapeutische Wirksamkeit (Jacquemin und Saint-Remy, 1998; Sethu *et al.*, 2012). Neben der Veränderung der Pharmakokinetik und der Neutralisierung der Wirkung des Therapeutikums,

sind ADAs in seltenen Fällen auch in der Lage, bei wiederholter Administration des mAKs, Hypersensitivitätsreaktionen (Typ I – IV; Coombs und Gell, 1968) auszulösen (Baldo, 2013; Sethu *et al.*, 2012; Tovey *et al.*, 2011; van Beers und Bardor, 2012). Während die ersten zwei genannten Effekte im schlimmsten Fall zum Wirksamkeitsverlust des therapeutischen mAKs führen und die einzige Konsequenz der Bedarf einer Administration höherer Dosen ist, um die Wirksamkeit weiterhin zu gewährleisten, können induzierte Hypersensitivitätsreaktionen ernste klinische Konsequenzen mit sich ziehen. Hierzu zählen unter anderem IgE-vermittelte anaphylaktische (Typ I-) und Immunkomplex-vermittelte (Typ III-) Reaktionen (Brennan *et al.*, 2010). Bei Letzteren kommt es durch die Anwesenheit der ADAs im Serum des Patienten zur Bildung von Immunkomplexen des Antikörpers mit dem therapeutischen Protein, die wiederum z.B. zur Serumkrankheit führen können (D'Arcy und Mannik, 2001; Todd und Helfgott, 2007). Prinzipiell treten solche Hypersensitivitätsreaktionen, im Gegensatz zu den Reaktionen des CRS, frühestens nach der zweiten Exposition auf (Scherer *et al.*, 2010). Symptomatisch sind die Hypersensitivitätsreaktionen jedoch schwer von den akuten Reaktionen eines CRS zu unterscheiden (Brennan *et al.*, 2010; Dillman, 1999). Oftmals werden beide Reaktionstypen unter dem Begriff „Infusionsreaktionen“ zusammengefasst (Dillman, 1999). Kreuzreaktionen von ADAs mit endogenen Antikörpern sind im Fall von mAK bislang nicht bekannt (Brennan *et al.*, 2010).

Bei den immunologischen Mechanismen, die über eine B-Zell-Aktivierung zu einer Produktion von ADAs führen, wird zwischen T-Zell-abhängigen und T-Zell-unabhängigen Reaktionen unterschieden (Brennan *et al.*, 2010; Mukovozov *et al.*, 2008; Sethu *et al.*, 2012).

Bei den T-Zell-abhängigen Reaktionen handelt es sich um die klassischen adaptiven Immunreaktionen auf ein Xenoantigen (Kap. 1.1.2). Hier wird das therapeutische Protein aufgrund seiner Größe und den Strukturunterschieden zum endogenen Protein vom humanen Immunsystem als körperfremd erkannt. Das Antigen wird von APCs aufgenommen, prozessiert und schließlich als Peptid-MHC II-Komplex T-Lymphozyten präsentiert. Die Erkennung des präsentierten Antigens durch den TCR der CD4⁺ T-Zellen sowie die Bindung von CD28 auf der T-Zell-Oberfläche an kostimulatorische B7-Moleküle auf APCs führen schließlich zur T-Zell-Aktivierung. Die aktivierten T-Lymphozyten stimulieren wiederum B-Zellen zur Proliferation und Differenzierung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen. Diese Immunreaktion führt letztendlich zur Produktion hoch affiner Antikörper gegen das therapeutische Protein und zur Generierung von Gedächtniszellen, welche bei wiederholtem Antigenkontakt in der Lage sind schneller und effektiver zu reagieren. Diese klassische Immunreaktion wird jedoch nicht nur als Reaktion auf fremde Epitope ausgelöst, sondern kann auch bei Patienten mit fehlender oder beeinträchtigter Immuntoleranz (Autoimmunerkrankungen, Gendefekte) gegenüber dem körpereigenen endogenen Protein auftreten (Schellekens, 2002b).

Neben der T-Zell-abhängigen Stimulation von B-Zellen können therapeutische Proteine auch als T-Zell-unabhängige Antigene agieren, welche die B-Zelle ohne T-Zell-Kostimulation aktivieren. Solche Antigene haben häufig repetitiv vorkommende Strukturen, über die sie BCRs kreuzvernetzen und dadurch die B-Zelle direkt aktivieren können (Bachmann und Zinkernagel, 1997). Ist ein therapeutisches Protein nahezu oder komplett homolog zum körpereigenen Protein, gegenüber dem eine immunologische Toleranz besteht, kann diese T-Zell-unabhängige B-Zell-Aktivierung zur Überwindung der Immuntoleranz und somit zur Antikörperproduktion führen (Goodnow, 2001; Kouskoff *et al.*, 2000). Dieser Mechanismus kann möglicherweise durch Zytokinfreisetzungen aktivierter T_H-Zellen oder durch unspezifische T-Zell-Interaktionen unterstützt werden (Ratanji *et al.*, 2014; Soulas *et al.*, 2005). Im Gegensatz zur klassischen Immunreaktion, resultiert die direkte Aktivierung von B-Zellen in einer Produktion von IgM geringer Affinität mit geringem Potenzial zum Klassenwechsel in IgG und bringt zudem kein immunologisches Gedächtnis (*Memory*-Zellen) hervor. Weitere Situationen, die zur Überwindung der Immuntoleranz führen können, sind eine wiederholte Präsentation des Autoantigens während der Behandlung, eine Kopplung fremder T-Zell-Epitope an das Autoantigen sowie die Anwesenheit von *Danger*-Signalen (Verunreinigungen, Aggregate) (Sethu *et al.*, 2012).

1.2.3.3 Klinische Erfahrungen mit monoklonalen Antikörpern

Die Administration von therapeutischen Antikörpern kann, wie detailliert im vorherigen Kapitel beschrieben (Kap. 1.2.3.2), schwerwiegende ADRs zur Folge haben, sodass viel Aufwand betrieben wurde, Antikörper mit reduzierter Immunogenität zu entwickeln. Im Mittelpunkt stand die Herstellung modifizierter mAks mit reduzierten murinen Strukturanteilen. Modifikationen ihrer Struktur und Effektorfunktionen ließen schließlich ihre therapeutische Relevanz weiter ansteigen. Hwang und Foote fassten im Jahr 2005 Daten klinischer Studien über ADAs, die durch mAks induziert wurden, zusammen und verglichen die Immunogenitäten der verschiedenen molekularen Antikörperformate (murin, chimär und humanisiert) miteinander (Abb. 7; Hwang und Foote, 2005). Sie verfolgten die zentrale Fragestellung, inwieweit der Ersatz der murinen Anteile durch humane Strukturen in therapeutischen Antikörpern die Inzidenz von Immunogenität beeinflusst. Hierzu wurden die induzierten ADAs basierend auf der Häufigkeit ihres Auftretens einem der drei Immunogenitätslevel zugeordnet: unerhebliche (ADAs in < 2 % der Patienten), tolerierbare (ADAs in 2 – 15 % der Patienten) sowie stark ausgeprägte (ADAs in > 15 % der Patienten) Immunogenität.

Die ausgeprägte Immunogenität muriner Antikörper ist bekannt. So induzierten diese therapeutischen Antikörper selten tolerierbare oder gar unerhebliche ADRs. Meist reagieren 100 % der Patienten mit ADAs gegen ihre murinen Anteile. Hwang und Foote stellten heraus, dass 84 % der 44 analysierten murinen mAks mit einer stark ausgeprägten Immunogenität

assoziiert sind (Hwang und Foote, 2005). Zu diesen mAk zählt auch der im Jahr 1985 zugelassene immunsuppressive murine Muromonab (Orthoclone OKT3®) zur Behandlung akuter Abstoßungsreaktionen nach allogener Nieren-, Herz- und Lebertransplantation (Smith, 1996). Sein Wirkmechanismus besteht darin, das CD3-Molekül des TCR reifer T-Lymphozyten zu erkennen, durch seine Bindung zu blockieren und somit eine Immunantwort zu inhibieren (Sgro, 1995). Es ist jedoch bekannt, dass diese Bindung von CD3 auch eine starke ADA-Produktion induzieren kann (Goldstein, 1987; Thistlethwaite *et al.*, 1988).

Wird die Fc-Region von murinen Antikörpern durch humane Sequenzen substituiert, ist dies der entscheidende Schritt in der Reduktion ihrer Immunogenität und der Inzidenz von ADRs (Hwang und Foote, 2005). Einige chimäre Antikörper wie beispielsweise Cetuximab und Rituximab wurden, im Vergleich zu murinen Antikörpern, mit deutlich weniger bis gar keinen ADAs assoziiert (Cetuximab: 5 % (Hwang und Foote, 2005), Rituximab: 0 % (Piro *et al.*, 1999)). Infliximab hingegen, ein chimärer anti-TNF- α Antikörper, induzierte bereits nach erster Infusion in bis zu 45 % der Patienten ADAs. Diese Inzidenz stieg nach der fünften Infusion sogar auf bis zu 61 % (Baert *et al.*, 2003). Hier ist wichtig zu erwähnen, dass klinische Daten zur Immunogenität einzelner therapeutischer mAk, in Abhängigkeit von der jeweiligen Indikation, meist mit einer hohen Variabilität assoziiert sind (Delluc *et al.*, 2011). So existieren beispielsweise für Rituximab auch klinische Daten, die eine höhere Inzidenz von ADAs aufzeigen (Looney *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2007). Insgesamt zeigten nach Hwang und Foote 40 % der 15 analysierten chimären Antikörper ein stark ausgeprägtes Potenzial zur Induktion von ADAs.

Eine Humanisierung therapeutischer Antikörper reduzierte schließlich den prozentualen Anteil von mAk mit stark ausgeprägter Immunogenität auf 9 % (22 analysierte humanisierte mAk). Der Anteil humanisierter mAk, der ADAs in ≤ 15 % der Patienten induzierte (unerhebliche bzw. tolerierbare Immunogenität) blieb jedoch mit dem der chimären Antikörper vergleichbar. Trotz aller Bemühungen, die Immunogenität von mAk durch eine Humanisierung ihrer molekularen Struktur weiter zu reduzieren, existieren auch humanisierte Antikörper, deren Potenzial zur Induktion von ADAs dem von murinen Antikörpern entspricht (Ritter *et al.*, 2001).

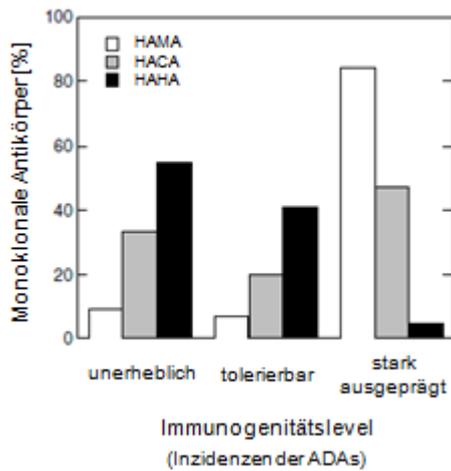


Abbildung 7: Immunogenitätslevel von monoklonalen Antikörpern unterschiedlicher molekularer Formate im Vergleich. Die Inzidenzen von ADAs in klinischen Studien wurden in Abhängigkeit vom molekularen Format der mAk gruppiert (murin, chimär, humanisiert) und einem der drei Immunogenitätslevel zugeordnet (unerheblich, tolerierbar, stark ausgeprägt). Die Daten zeigen den prozentualen Anteil der mAk der jeweiligen Formate, deren Immunogenität, resultierend aus der Inzidenz induzierter ADAs, den einzelnen Leveln zugeordnet wurde. HAMA: humane anti-murin Antikörper; HACA: humane anti-chimär Antikörper; HAHA: humane anti-humanisiert Antikörper; ADAs: *anti-drug*-Antikörper (modifiziert nach Hwang und Foote, 2005).

Auch bei vollständig humanen mAk kann es zu einer ADA-Entwicklung kommen. Ein Beispiel hierfür ist der therapeutische humane anti-TNF- α Antikörper Adalimumab. Adalimumab induzierte in Abhängigkeit vom Krankheitsbild und von der Therapie ADAs in 5 % bis 87 % der Patienten (Bender *et al.*, 2007; Radstake *et al.*, 2009; West *et al.*, 2008). Trotz dieser hohen Varianz der Inzidenzen zeigen Studien, die die Inzidenzen von ADAs nach Adalimumab-Behandlung mit denen nach Infliximab-Therapie verglichen, dass ein geringerer prozentualer Anteil der Patienten ADAs gegen Adalimumab entwickelten (17 %) als gegen Infliximab (57 %; West *et al.*, 2008). Gleichzeitig fiel die Wirksamkeit von Adalimumab im Vergleich zu einer Infliximab-Therapie um 10 % höher aus. Die klinische Wirksamkeit korrelierte folglich mit dem Level neutralisierender ADAs gegen Adalimumab bzw. Infliximab (Bobbio-Pallavicini *et al.*, 2007; Kievit *et al.*, 2007; Radstake *et al.*, 2009).

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel ausführlich beschrieben, ist eine weitere potenzielle ADR von mAk die systemische Freisetzung proinflammatorischer Zytokine im Rahmen des CRS. Auch hier variieren die Inzidenzen bei verschiedenen mAk, dennoch ruft diese ADR größte Bedenken hervor. Auslöser hierfür war der viel publizierte Vorfall eines CRS, des sogenannten „Zytokin-Sturms“ (*cytokine storm*), bei Probanden einer klinischen Phase-I-Studie im März 2006 nach Administration des superagonistischen anti-CD28 mAks TGN1412. Ursprünglich wurde dieser als CD28SA (CD28-Superagonist) für den therapeutischen Einsatz bei Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis und Multipler Sklerose entwickelt. Ausschlaggebend hierfür war die Erkenntnis, dass TGN1412 in niedrigen Konzentrationen in Ratten eine selektive, transiente Aktivierung und Expansion von T_{reg} -Zellen induzierte, die wichtige zelluläre Regulatoren von Immunreaktionen darstellen (Beyersdorf *et al.*, 2005; Lin und Hünig, 2003). Höhere Dosen TGN1412 hingegen waren in der Lage *in vivo* sowohl T_{reg} -Zellen als auch konventionelle T-Lymphozyten zu aktivieren. Die Ergebnisse aus *in vivo* Studien an Affen führten letztendlich zu einer fatalen Fehleinschätzung und zu einer deutlich überhöhten Dosierung von TGN1412 in der klinischen Studie mit der Folge lebensbedrohlicher

systemischer Entzündungsreaktionen bei allen Probanden (Suntharalingam *et al.*, 2006). Die Ergebnisse aus *in vivo* Studien an Ratten mit einem Surrogat, in denen es zu massiven CRS-Reaktionen kam, wurden leider nicht berücksichtigt.

TGN1412 war nicht der einzige mAk mit dem Potenzial ein CRS auszulösen. Auch einige bereits zugelassene mAks tragen mittlerweile eine sogenannte „*Black Box* Warnung“ (USA) für solche akuten Infusionsreaktionen, insbesondere CRS (Brennan *et al.*, 2010). Ein weiteres klassisches Beispiel hierfür ist der murine anti-CD3 Antikörper Muromonab (Abramovicz *et al.*, 1989; Bugelski *et al.*, 2009; Gaston *et al.*, 1991; Scherer *et al.*, 2010).

Auch Rituximab löste in klinischen Studien bereits ein CRS aus (Agarwal *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2014; Winkler *et al.*, 1999). Während Rituximab in den meisten Patienten schwache bis moderate Infusionsreaktionen (*Flu-like* Symptome) induzierte, entwickelten sich ernsthafte Reaktionen lediglich bei etwa 10 % der Patienten (Chung, 2008; Plosker und Figgitt, 2003).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit relevanten therapeutischen mAks oder Analoge hierzu sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 4: Relevante therapeutische monoklonale Antikörper im Rahmen der vorliegenden Dissertation.

Generischer Name	Handelsname	Typ	Antigen / Zielstruktur	Indikation
Cetuximab	Erbix®	chimär	EGFR / ErbB1/Her1	Kolonkarzinom
TGN1412	Nicht kommerziell erhältlich*	humanisiert	CD28	Autoimmunerkrankungen, Leukämie
Muromonab	Orthoclone® OKT3	murin	CD3	Transplantat-Abstoßungen
Rituximab	MabThera®	chimär	CD20	Non-Hodgkin-Lymphom, Rheumatoide Arthritis (RA), Chronische lymphozytäre Leukämie (CLL)
Ofatumumab	Arzerra®	human	CD20	Chronische lymphozytäre Leukämie (CLL)
Infliximab	Remicade®	chimär	TNF- α	Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Psoriasisarthritis
Adalimumab	Humira®	human	TNF- α	Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, Psoriasisarthritis, inflammatorische Erkrankungen (Autoimmunerkrankungen)

* In der immunologischen Forschung wird heutzutage oftmals ANC28.1 (Klon ANC28.1/5D10) als Analogon des mAks TGN1412 eingesetzt.

1.2.4 Methoden zur Identifikation potenzieller Immunogenität

Während für die Vorhersage unerwünschter immunsuppressiver Effekte von Arzneimittelkandidaten standardisierte und validierte Tiermodelle und *in vitro* Methoden existieren (Descotes, 2006), sind für eine potenzielle Immunstimulation, mit Ausnahme von Hypersensitivitätsreaktionen des Typ IV, keine geeigneten Methoden verfügbar. Da solche Überreaktionen beim Umgang mit biotechnologisch hergestellten Arzneimitteln im Vordergrund stehen, ist eine adäquate präklinische Bewertung ihres immunogenen Potenzials bereits vor den klinischen *First-In-Human* (FIH)-Studien notwendig. Aufgrund ihrer stetig steigenden therapeutischen Relevanz stehen hier vor allem mAk im Fokus. Die vielfältigen klinischen Erfahrungen mit adversen, mAk-assoziierten Effekten verdeutlichen, dass präklinische Studien nur limitierte Informationen über die Immunogenität von Biologika, speziell von mAk, liefern können (Descotes, 2009). Selbst Tierstudien liefern oftmals nur unzureichende Informationen über die zu erwartende Wirkung und das Nebenwirkungsprofil eines Stoffes bei Verabreichung am Patienten. So führten Ergebnisse aus präklinischen Toxizitätsstudien bereits in der Vergangenheit zu fatalen Fehleinschätzungen der zu erwartenden Reaktionen im Patienten. Hier ist die Induktion eines lebensbedrohlichen Zytokinsturms bei sechs gesunden Probanden nach Administration des mAks TGN1412 im Rahmen einer klinischen Phase-I-Studie zu nennen (Kap. 1.2.3.3). Dies demonstriert die Komplexität einer (therapeutischen) Immunstimulation und die damit einhergehende Herausforderung für präklinische Studien. In präklinischen Immuntoxizitätsstudien stellt nicht zuletzt die Selektion der relevanten Tierspezies ein Problem dar (Cavagnaro, 2002; Chapman *et al.*, 2007). Durch die Entwicklung zunehmend humanspezifischer mAk wird die Relevanz von in Tierstudien ermittelten adversen Reaktionen verstärkt in Frage gestellt (Descotes, 2009). Insbesondere für den Endpunkt einer potenziellen Immunstimulation fehlt es an standardisierten, zuverlässigen Methoden. In der immunotoxikologischen Forschung ist hier die Ergänzung der *in vivo* Studien mit geeigneten humanen *in vitro* Screening-Modellen von Interesse, um Biologika bereits in ihrer frühen Entwicklungsphase auf ihr immunogenes Potenzial im Menschen zu untersuchen und mögliche Risiken von Arzneimittelkandidaten zu identifizieren.

Im Fokus stehen unter anderem *in vitro* Methoden, die es ermöglichen, therapeutische mAk hinsichtlich ihres Potenzials systemische Zytokinfreisetzung auszulösen, zu bewerten. Bis heute besteht in der Forschung kein Konsens darüber, welche Methode für eine präklinische Evaluierung am besten geeignet ist (Finco *et al.*, 2014). Einige Forscher nutzen humanes Vollblut, verdünnt (Walker *et al.*, 2010) oder unverdünnt (Bailey *et al.*, 2013; Wolf *et al.*, 2012), während andere wiederum den Gebrauch isolierter PBMCs befürworten (Findlay *et al.*, 2010). Auch in der Art der Präsentation der mAk an die Effektorzellen gibt es Unterschiede. Während die zu testenden Antikörper innerhalb der Vollblut-Methode meist in löslicher Form zugegeben werden (Bailey *et al.*, 2013; Wolf *et al.*, 2012), erfolgt die Präsentation an PBMCs oft in

immobilisierter, plattengebundener Form (Findlay *et al.*, 2010; Stebbings *et al.*, 2007; Eastwood *et al.*, 2010; Eastwood *et al.*, 2013). Die Beschichtung der Platten mit mAk kann auf unterschiedliche Weise erfolgen: durch eine Inkubation der Platten mit den Antikörpern in Lösung und anschließendem Waschschrift (*wet-coating*) oder durch Verdunstung eines dünnen Flüssigkeitsfilms, der die mAk enthält, wodurch diese an der Platte antrocknen (*dry-coating*). Diese zusätzliche Immobilisierung der Antikörper auf dem Boden der Zellkulturplatte soll den Mechanismus der Kreuzvernetzung (*cross-linking*) abbilden, der *in vivo* eine systemische Zytokinfreisetzung verstärken kann. Im optimalen Fall werden die mAk so über ihre Fc-Regionen an den Plattenboden gebunden. Die anschließende Bindung der variablen Region an die spezifischen Rezeptoren auf den entsprechenden Zielzellen führt schließlich zur erhöhten Stimulation dieser Zellen (Findlay *et al.*, 2010).

Über Methoden zur Detektion systemischer Zytokinfreisetzungen hinaus sind *in vitro* Assays von Interesse, die einzelne Schlüsselereignisse (*key events*) analysieren, welche für die Initiation einer Immunreaktion und folglich für die Bildung von ADAs essentiell sind. Hier spielen beispielsweise *in silico* Studien von Bindungsaffinitäten bestimmter Peptidsequenzen an definierte HLA-Allele (HLA-Bindungsassays), Analysen von HLA-Klasse-II-präsentierter Peptide auf DCs, Analysen der modulierten DC-Funktion sowie einer induzierten DC- und T-Zell-Aktivierung eine Rolle (Brennan *et al.*, 2010). Im Gegensatz zum *in vivo* Vorgehen, bei dem die finale ADA-Produktion durch B-Zellen untersucht wird, fokussieren sich *in vitro* Modelle auf die vorangehenden T-Zell-Reaktionen (Brennan *et al.*, 2010). Neben Modellen, die sowohl DC-Funktionen als auch T-Zell-Reaktionen integrieren, sind auch Sequenzanalysen und die Vorhersage und Identifizierung antigener Epitope (*Epitope Mapping*) essentiell (Sethu *et al.*, 2012). Von besonderer Bedeutung ist darüber hinaus die physikochemische Charakterisierung des Produktes, um mögliche Faktoren wie Verunreinigungen, Heterogenität, Aggregatbildung oder Proteindegradation frühzeitig zu erkennen (De Groot und Scott, 2007).

Informationen, die mittels solcher Teststrategien generiert werden, können letztendlich zur Erstellung eines Immunogenitätsprofils des Arzneimittelkandidaten beitragen. Bereits in der Vergangenheit wurden, im Rahmen der Etablierung von *in vitro* Testsystemen zur Hautsensibilisierung, einzelne Schlüsselereignisse im Rahmen des Konzepts des *Adverse Outcome Pathways* (AOP) zu einer Teststrategie zusammengefasst (Reisinger *et al.*, 2015). Auch die Entwicklung komplexerer humaner *in vitro* Modelle zur umfassenden Evaluierung von induzierten immunologischen Reaktionen durch Biologika blieb in der Vergangenheit nicht ungeachtet. So wurde beispielsweise ein artifizielles humanes Lymphknotenmodell (*human artificial lymph node*, huALN) in Form eines miniaturisierten Bioreaktors entwickelt, welches ein mögliches *in vitro* Tool darstellen soll, um die Lücke zwischen präklinischen Tiermodellen und FIH-Studien zu schließen (Giese und Marx, 2007; Giese *et al.*, 2010).

1.3 Ziel der Arbeit

Biopharmazeutika basieren auf biologischen Molekülen und haben das Potenzial Immunreaktionen im Patienten auszulösen. Diese Immunreaktionen reichen von der Reduktion der Wirksamkeit der Biopharmazeutika bis hin zu schweren, lebensbedrohlichen Nebenwirkungen. Die Vorhersagbarkeit immunogener Reaktionen auf Basis präklinischer Studien ist bislang jedoch limitiert. Traditionelle Tiermodelle sind aufgrund der Xenogenität humaner Biopharmazeutika im Tier und existierender Speziesunterschiede für die Vorhersage potenzieller Immunogenität im Menschen nur begrenzt aussagekräftig. In der immuntoxikologischen Forschung ist hier die Ergänzung der *in vivo* Studien um geeignete humane *in vitro* Screening-Modelle von Interesse, um Biologika bereits in der frühen Entwicklungsphase auf ihr immunogenes Potenzial im Menschen zu untersuchen und mögliche Gefahren zu identifizieren.

Im Fokus dieser Arbeit steht die Entwicklung und Evaluierung von zwei humanen *in vitro* Modellen zur Detektion immunstimulierender Wirkungen durch Biologika wie Modell-Antigene und (therapeutische) mAk.

Das erste *in vitro* Modell adressiert ADRs in Form einer Produktion antigenspezifischer Antikörper gegen den Wirkstoff (*Anti-Drug-Antikörper*) als Reaktion auf die xenogenen Anteile eines Biologikums. Im Gegensatz zu *in vivo* Studien soll der Fokus dieses *in vitro* Testsystems jedoch auf früheren Endpunkten liegen. Somit steht hier die Entwicklung eines Kokultursystems aus humanen DCs und T-Lymphozyten im Vordergrund. Ziel ist es, die Aktivierung von DCs und eine darauf folgende Initiierung antigenspezifischer Reaktionen von T-Lymphozyten zu untersuchen und Bedingungen zu testen, die zu einer solchen Aktivierung führen.

Das zweite humane *in vitro* Modell befasst sich mit dem akuten Effekt einer systemischen Zytokinfreisetzung (*Cytokine Release Syndrom*, CRS), welcher in der Klinik als adverse Reaktion auf therapeutische mAk auftreten kann (*First-dose* Phänomen). Zur Etablierung eines *Cytokine Release Assays* sollen zwei verschiedene Assayformate untersucht werden. Ziel ist der abschließende Vergleich der *in vitro* generierten Ergebnisse mit dem bekannten klinischen Potenzial der getesteten mAk zur Auslösung systemischer Zytokinfreisetzungen im Patienten (Vergleich von *high risk* mit *low risk* mAk).

Untersucht wird im Rahmen beider Modelle, welche immunstimulatorischen Reaktionen abgebildet werden können und inwiefern die Modelle zur Identifizierung immunogener Reaktionen geeignet sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Standardlabormaterialien

Produkt	Hersteller
24-Well-Platten, Flachboden, TC-treated, Polystyren, steril	BD Biosciences, USA
96-Well-Platten, Flachboden, TC-treated, Polystyren, steril	BD Biosciences, USA
96-Well-Platten, Rundboden, Polypropylen, steril	Corning, USA
96-Well-Platten, Rundboden, TC-treated, Polystyren, steril	BD Biosciences, USA
96-Well-Platten, V-Boden, TC-treated, Polystyren, steril	Greiner Bio-One, Österreich
autoMACS® Separationssäulen (5×2)	Miltenyi Biotec, Deutschland
Bechergläser, 200 ml, 500 ml	Fisherbrand / Fisher Scientific, Deutschland
Bördelkappen, Aluminium, mit PTFE/Butylgummiseptum	Perkin Elmer, USA
Combitips advanced Biopur®, 1 ml, 2,5 ml, 5,0 ml, 10 ml, 50 ml	Eppendorf, Deutschland
Cytoclip™ Objektträger-Halterungsclip	Thermo Fisher Scientific, USA
Cytofunnel, double, Proben-Kammer (TPX sample chambers)	Thermo Fisher Scientific, USA
Deckgläser, 24×50 mm, Stärke No.1	Marienfeld-Superior, Deutschland
Dialyse Kasette, Slide-A-Lyzer® G2, 3.5K MWCO, 15 ml	Thermo Fisher Scientific, USA
Einfriergerät Mr.Frosty™	Thermo Fisher Scientific, USA
Einmalkanülen Sterican®, 0,45×25 mm, Gr. 18	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Einmalspritzen mit Kanüle / Tuberkulin Spritzen, 0,5×16 mm, 1 ml	BD Biosciences, USA
Einmalspritzen NORM-JECT®, 10 ml	Henke Sass Wolf, Deutschland
Einmalspritzen Omnifix Solo®, steril, 5 ml, 10 ml	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Einmalspritzen, steril, 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Eppendorf Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Erlmeyerkolben	DURAN Group, Deutschland
FACS-Röhrchen, 75×12 mm, PS, 5 ml	Sarstedt, Deutschland
Falcons, konisch, PP, steril, 15 ml, 50 ml, 175 ml	Thermo Fisher Scientific, USA
Headspace-Vials mit Rollrand (20 mm), Braunglas, 20 ml	WICOM, Deutschland

Kanülen, steril	Terumo, USA
Kristallisationsschale	DURAN Group, Deutschland
Kryoröhrchen Nalgene™, PP, steril, 1 ml, 1,2 ml, 1,5 ml für Langzeitlagerung	Thermo Fisher Scientific, USA
Kryoröhrchen Nunc™, PP, 1 ml	Thermo Fisher Scientific, USA
Leucosep-Röhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One, Österreich
Matrix™ Box mit Kryoröhrchen, 0,75 ml	Thermo Fisher Scientific, USA
Matrix™ SepraSeal Capping System	Thermo Fisher Scientific, USA
Medizinische Untersuchungshandschuhe Nitril	Thermo Fisher Scientific, USA
Mehrkanalpipette, elektronisch, Viaflo, Voyager-8-channel, 125 µl, 1250 µl	Integra Biosciences, Schweiz
Messzylinder, 500 ml	Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
MICROMAN® M1000 (für Viskoses)	Gilson, Inc., USA
Mini-Zellschaber (für 96-Well-Platten)	LEAP Biosciences Corp., USA
Multipette®	Eppendorf, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand, Deutschland
Objektträger SuperFrost®	Gerhard Menzel GmbH, Deutschland
Parafilm `M`	Pechiney Plastic Packaging, USA
Pipettenspitzen, Capillary Pistons CP1000 für MICROMAN®	Gilson, Inc., USA
Pipettenspitzen ep T.I.P.S.® (mit und ohne Dualfilter)	Eppendorf, Deutschland
Pipettenspitzen Viaflo, 125 µl, 1250 µl	Integra Biosciences, Schweiz
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark Professional, UK
Probengefäße für Coulter Counter®, 20 ml	Greiner Bio-One, Österreich
Reagenzien-Reservoirs, nicht steril, 25 ml, 100 ml	Corning, USA
Reagenzien-Reservoirs, steril, 25 ml, 100 ml	Thermo Fisher Scientific, USA
Reinstwassersystem MilliQ	Merck Millipore, Deutschland
Röhrchen für Durchflusszytometrie	Sarstedt, Deutschland
Röhrchen Corning® Falcon™, PP, steril, 15 ml, 50 ml	Corning, USA
Safe-Lock Mikrotubes, Biopur®, PP, steril, 0,5 ml, 1,5 ml	Eppendorf, Deutschland
Safe-Lock Mikrotubes, PP, unsterile, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf, Deutschland
Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning, USA
S-Monovetten®, 75x15 mm	Sarstedt, Deutschland
Spritzen, 1 ml, 10 ml	BD Biosciences, USA
Sterilfilter Minisart®, 0,20 µm	Sartorius, Deutschland
TBC-Spritzen ERSTA, 1 ml	CODAN Medical, Deutschland
Transferpipetten	Sarstedt, Deutschland

Vasofix® Braunüle, 1,3×45 mm, 18G	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Vorratsflaschen Easy Grip, PS, 1 L	Corning, USA
Zellkulturflaschen, T25, 50 ml (0,2 µm vented blue plug seal cap)	BD Biosciences, USA
Zellkulturflaschen, T75, 250 ml (0,2 µm vented blue plug seal cap)	BD Biosciences, USA
Zellschaber Nunc™, 23 cm, steril	Thermo Fisher Scientific, USA

2.1.2 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Produkt	Hersteller
2-Propanol (Isopropanol)	Sigma-Aldrich, USA
7-AAD	BD Pharmingen™, USA
Aceton	Merck, Deutschland
autoMACS® Rinsing Solution	Miltenyi Biotec, Deutschland
autoMACS® Running Buffer	Miltenyi Biotec, Deutschland
Biocoll-Trennlösung (ρ: 1,077 g/ml)	Merck Millipore, Deutschland
Dextran Fluorescein, 40.000 MW, anionisch	Thermo Fisher Scientific, USA
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, USA
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Saline -/- (DPBS, 1×, ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	Gibco, UK
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Saline +/- (DPBS, 1×, mit Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	Gibco, UK
Ethanol, EMSURE®	Merck Millipore, Deutschland
FACSClean™	BD Biosciences, USA
FACS Cytometer Setup and Tracking Beads (CS-T Beads)	BD Biosciences, USA
FACSFlow™	BD Biosciences, USA
FACSRinse™	BD Biosciences, USA
Flächendesinfektionsmittel DESOMED® Rapid AF	Desomed Dr. Trippen GmbH, Deutschland
Flächendesinfektionsmittel Microbac® forte	Paul Hartmann AG, Deutschland
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck Millipore, Deutschland
Händedesinfektionsmittel Desderman® pure	Schülke & Mayr GmbH, Deutschland
ISOTON® II Diluent, 20 L	Beckmann Coulter, USA
Latex Partikel CC Size Standard L10 (nominal 10 µm)	Beckmann Coulter, USA
May-Grünwalds Eosin-Methylenblaulösung modifiziert	Merck Millipore, Deutschland

Methanol, EMSURE®	Merck Millipore, Deutschland
Natriumazid ReagentPlus® (≥ 99,5 %)	Sigma-Aldrich, USA
Ovalbumin Fluorescein Conjugate, 45.000 MW	Thermo Fisher Scientific, USA
Propidiumiodid Staining Solution	BD Pharmingen™, USA
Puffertabletten pH 7,2 zur Herstellung von Pufferlösungen nach WEISE	Merck Millipore, Deutschland
Trypanblau-Lösung [0,4 %]	Sigma-Aldrich, USA
Tween® 20, BioXtra (viscous liquid, Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat)	Sigma-Aldrich, USA
Wasser, EndoGrade® (hochrein; <0,001 EU/ml)	Hyglos, Deutschland
ZAP-OGLOBIN®	Beckman Coulter, USA

2.1.3 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

Antikörper	Klon	Hersteller
CD3 PE Maus anti-Human	HIT3a	BD Pharmingen™, USA
CD4 FITC Maus anti-Human	RPA-T4	BD Pharmingen™, USA
CD11c FITC Maus anti-Human	B-LY6	BD Pharmingen™, USA
CD11c PE Maus anti-Human	B-LY6	BD Pharmingen™, USA
CD14 APC Maus anti-Human	TÜK4	Miltenyi Biotec, USA
CD14 PE Maus anti-Human	TÜK4	Miltenyi Biotec, USA
CD25 APC Maus anti-Human	M-A251	BD Pharmingen™, USA
CD25 PerCP-Cy™5.5 Maus anti-Human	M-A251	BD Pharmingen™, USA
CD40 PE-Cy™7 Maus anti-Human	5C3	BD Pharmingen™, USA
CD80 PE Maus anti-Human	L307.4	BD Pharmingen™, USA
CD80 PE-Cy7 Maus anti-Human	L307.4	BD Pharmingen™, USA
CD83 APC Maus anti-Human	HB15e	BD Pharmingen™, USA
CD86 FITC Maus anti-Human	FUN-1	BD Pharmingen™, USA
CD86 PE / CD209 PerCP-Cy™5.5 / CD83 APC Maus anti-Human (Multicolor)	FUN-1 / DCN46 / HB15e	BD Pharmingen™, USA
CD209 APC Maus anti-Human	DCN46	BD Pharmingen™, USA
HLA-DR APC Maus anti-Human	L243	BD Biosciences, USA
HLA-DR FITC Maus anti-Human	L243	BD Pharmingen™, USA
IgG1κ APC Maus anti-Human	MOPC-21	BD Pharmingen™, USA
IgG1κ FITC Maus anti-Human	MOPC-21	BD Pharmingen™, USA
IgG1κ PE-Cy™7 Maus anti-Human	MOPC-21	BD Pharmingen™, USA
IgG1κ PE Maus anti-Human	MOPC-21	BD Pharmingen™, USA

IgG2a APC Maus anti-Human	S43.10	Miltenyi Biotec, Deutschland
IgG2a FITC Maus anti-Human	X39	BD Pharmingen™, USA
IgG2a PE Maus anti-Human	G155-178	BD Pharmingen™, USA
IgG2b κ APC Maus anti-Human	27-35	BD Pharmingen™, USA
IgG2b κ PerCP-Cy™5.5 Maus anti-Human	27-35	BD Pharmingen™, USA
MicroBeads Maus anti-Human CD4	-	Miltenyi Biotec, Deutschland
MicroBeads Maus anti-Human CD14	-	Miltenyi Biotec, Deutschland

2.1.4 Kulturmedien und Zusätze

Produkt	Hersteller
Bovine Serum Albumin-Lösung, BioXtra (BSA; 30 %)	Sigma-Aldrich, USA
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco, UK
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Österreich
L-Glutamin [200 mM]	Gibco, UK
Natriumpyruvat [100 mM]	Gibco, UK
Nichtessentielle Aminosäuren (MEM NEAA, 100x)	Gibco, UK
Primocin [50 mg/ml]	InvivoGen, Frankreich
Prostaglandin E2	Sigma-Aldrich, USA
Recombinant Human GM-CSF	R&D Systems, Deutschland
Recombinant Human IL-1 β	R&D Systems, Deutschland
Recombinant Human IL-4	R&D Systems, Deutschland
Recombinant Human IL-6	R&D Systems, Deutschland
Recombinant Human TNF- α	R&D Systems, Deutschland
RPMI 1640 Medium, 1 \times , pH 7,2 (mit L-Glutamin und Phenolrot)	Gibco, UK
β -Mercaptoethanol [99 %; 50 mM]	Sigma-Aldrich, USA

2.1.5 Stimulantien

Produkt	Hersteller
Concanavalin A (Typ IV) aus <i>Canavalia ensiformis</i>	Sigma-Aldrich, USA
Imject™ Mariculture KLH (mckLH)	Pierce Biotechnology / Thermo Fisher Scientific, USA
Keyhole Limpet Hemocyanin aus <i>Megathura crenulata</i>	Sigma-Aldrich, USA
Keyhole Limpet Hemocyanin aus <i>Megathura crenulata</i> (high purity; \leq 12 EU/mg) [4,2 mg/ml]	Merck Millipore, Deutschland

Lipopolysaccharid aus <i>Escherichia coli</i> 055:B55	Sigma Aldrich, USA
Mitomycin C	Sigma Aldrich, USA
Ovalbumin (Albumin aus Hühnereiweiß)	Sigma-Aldrich, USA
Ovalbumin, EndoGrade® (Endotoxin-frei; < 0,1 EU/mg)	Hyglos, Deutschland
Phytohemagglutinin-L aus <i>Phaseolus vulgaris</i>	Roche, Schweiz

Tabelle 5: Experimentell verwendete (therapeutische) monoklonale Antikörper zur *in vitro* Stimulation humaner Zellen.

Handelsname	Generischer Name	Typ	Isotyp	Hersteller
ANC28.1/5D10	--	murin	IgG1 κ	Ancell Corporation, USA Merck Millipore, Deutschland
Arzerra®	Ofatumumab	human	IgG1 κ	Glaxo Operations UK Limited, UK
Erbitux®	Cetuximab	chimär	IgG1 κ	Merck Serono, Deutschland
Humira®	Adalimumab	human	IgG1 κ	AbbVie, Deutschland
MabThera®	Rituximab	chimär	IgG1 κ	Roche, Schweiz
Orthoclone® OKT3 (LEAF™ Purified anti-human CD3 Antibody)	--	murin	IgG2 α	BioLegend, USA
Remicade®	Infliximab	chimär	IgG1 κ	MSD Sharp & Dohme GmbH / Merck Serono, Deutschland

2.1.6 Kommerzielle Testsysteme (Kits)

Produkt	Hersteller
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology / Thermo Fisher Scientific, USA
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit	Sigma-Aldrich, USA
PyroDetect Cryoblood	Merck Millipore, Deutschland
PyroDetect Endotoxin Standard	Merck Millipore, Deutschland
PyroDetect Kit	Merck Millipore, Deutschland
V-PLEX Proinflammatory Panel 1 (human)	Meso Scale Discovery, USA

2.1.7 Laborgeräte

Produkt	Hersteller
Absaugsystem mit Vakuumpumpe VACUSAFE	Integra Biosciences, Schweiz
Absorbance Microplate Reader ELx808™	BioTek Instruments, USA

Absorbance Microplate Reader SpectraMax® Plus 384	Molecular Devices, USA
Analysewaage AE 200	Mettler, Deutschland
autoMACS® Separator	Miltenyi Biotec, Deutschland
Axio Scan.Z1	Zeiss, Deutschland
Coulter Counter® Multisizer™3	Beckman Coulter, USA
Durchlichtmikroskop Laborlux S	Leitz Wetzlar, Deutschland
Durchlichtmikroskop Zeiss Axioskop	Zeiss, Deutschland
DynaPro® Plate Reader™	Wyatt Technology, USA
Eismaschine	Ziegra, Deutschland
FACSCanto™ II	BD Biosciences, USA
Handstückzähler	Baumer, Deutschland
Heiz-/ Magnetplatte	IKA-Labortechnik, Deutschland
Inkubator Heraeus® BBD 6220	Thermo Fisher Scientific, USA
Laborautoklav 5075 biomedis®	Biomedis Laborservice GmbH, Deutschland
Mikroskop, Fluoreszenz, Biozero BZ-8000	Keyence, Deutschland
MSD® SECTOR Imager 2400	Meso Scale Discovery, USA
Multipette® plus	Eppendorf, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH, Deutschland
Objektiv Achroplan 100×/1,25 Öl	Zeiss, Deutschland
Objektiv Achrostigmat 40×/0,65	Zeiss, Deutschland
Objektiv PL Fluotar	Leitz Wetzlar, Deutschland
6,3×/0,20	
16×/0,45	
25×/0,60	
40×/0,70	
100×/1,32 Öl	
Plattenschüttler Titramax 101	Heidolph Instruments GmbH, Deutschland
Pipetus® Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
Reagenzglasschüttler REAX2000	Heidolph Instruments GmbH, Deutschland
Schüttelwasserbad 1083	GFL, Deutschland
Sicherheitswerkbank HERAsafe™	Thermo Fisher Scientific, USA
Vortex-Gerät REAX 2000	Heidolph, Deutschland
Wärmeschrank Heraeus® T6060	Thermo Fisher Scientific, USA
Zentrifuge Heraeus® Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific, USA
Zentrifuge Heraeus® Multifuge 4KR	Thermo Fisher Scientific, USA
Zentrifuge Heraeus® Multifuge X3 FR	Thermo Fisher Scientific, USA

Zentrifuge 5451 R
 Zytocentrifuge Cytospin® 4 Shandon

Eppendorf, Deutschland
 Thermo Fisher Scientific, USA

2.1.8 Software

Produkt	Hersteller
BZ-Analyzer	Keyence, Deutschland
DYNAMICS® 7.1.9	Wyatt Technology, USA
FACSDiva™ Software	BD Biosciences, USA
Gen5™ Datenanalyse-Software	BioTek Instruments, USA
Genedata Profiler 10.0 – Analyst Modul	Genedata AG, Schweiz
GraphPad Prism 6.0 und 7.0	GraphPad Software, Inc., USA
MSD Discovery Workbench® Analysis Software	Meso Scale Discovery, USA
SoftMax Software	Molecular Devices, USA
ZEN 2 Mikroskop- und Imaging Software (Blue Edition)	Zeiss, Deutschland

2.1.9 Zellen

Tabelle 6: Experimentell verwendete Zellen und deren Bezugsquelle.

Experiment	Bezugsquelle der Zellen
Entwicklung moDCs / Endozytose	PBMCs(*): Isolation aus Vollblut (CRS) / STEMCELL Techn.
Kokultur	
Etablierung Kokultur (KLH / OVA)	PBMCs*: Isolation aus <i>Buffy Coats</i> / STEMCELL Techn. CD4 ⁺ : STEMCELL Techn.
Erweiterte Kokultur	PBMCs*: Isolation aus <i>Buffy Coats</i> CD4 ⁺ : MACS aus CD14-negative Fraktion**
Kokultur mAk	PBMCs*: STEMCELL Techn. CD4 ⁺ : STEMCELL Techn.
MLR	PBMCs: STEMCELL Techn. CD4 ⁺ : MACS aus CD14-negative Fraktion**
Cytokine Release Assay	PBMCs: Isolation aus Vollblut (CRS)

* für eine anschließende CD14-Zellseparation (MACS)

** Gewinnung einer CD14-positiven und CD14-negativen Zellfraktion aus PBMCs (Isolation aus *Buffy Coats*), Kryokonservierung der CD14-negativen Fraktion für eine spätere Verwendung

Inkubation der Zellen erfolgt unter Standardbedingungen:

Im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit

2.1.10 Medien und Lösungen

Zellkultur

Fötale Kälberserum (FCS):

Auftauen des tiefgefrorenen Serums bei 4 °C
Hitzeinaktivierung bei 56 °C für 30 Min.
Lagerung bei -20 °C

β-Mercaptoethanol (2-ME) [50 mM]:

2-ME in PBS (-/-) verdünnen
Lagerung bei -20 °C

Isolation humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Waschmedium

1×RPMI 1640 (mit L-Glutamin und Phenolrot)
Primocin [100 µg/ml]

Kryokonservierung von Primärzellen

Einfriermedium:

FCS + 20 % DMSO
Zugabe zu den in FCS eingestellten Zellen
im Verhältnis 1:1
Finale Konzentrationen:
90 % FCS + 10 % DMSO

Durchflusszytometrische Zellpopulationsanalyse

Färbepuffer für FACS-Analysen:

PBS (-/-) mit 0,02 % Natriumazid versetzen

Färbung nach Pappenheim

WEISE-Puffer (zur Verdünnung von Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung):

Eine Puffertablette in 1 L *A. bidest* lösen

Messung der Endozytose

PBS-Azid (0,01 %):

PBS (-/-) mit 0,01 % Natriumazid versetzen

Messung der Endozytose – Fortsetzung

DX-FITC

Stocklösung: 25 mg/ml
Rekonstitution in 0,01 % PBS-Azid
Wiederholte Einfrier-/ Auftau-Zyklen vermeiden
Lagerung bei -20 °C
Vor Gebrauch in Mikrozentrifuge zentrifugieren (5 Min., 12 000 x g, RT), um mögliche Proteinaggregate zu entfernen

OVA-FITC

Stocklösung: 5 mg/ml
Rekonstitution in 0,01 % PBS-Azid
Wiederholte Einfrier-/ Auftau-Zyklen vermeiden
Lagerung bei -20 °C
Vor Gebrauch in Mikrozentrifuge zentrifugieren (5 Min., 12 000 x g, RT), um mögliche Proteinaggregate zu entfernen

Waschmedium:

PBS (-/-)
1 % FCS
0,01 % Natriumazid

Nachweis von Zytokinen mittels Elektrochemilumineszenz (MSD)

PBS-Tween (0,05 %):

PBS (-/-) mit 0,05 % Tween® 20 versetzen

Gemischte Lymphozytenreaktion

Mitomycin C (MitC):

Stocklösung: 0,5 mg/ml (blau/lila, leicht trübe Lösung)
Rekonstitution in *A. bidest*
Steril filtrieren
Bei lichtgeschützter Lagerung bei 2-8 °C zwei Wochen haltbar

Reifung dendritischer Zellen

Rekombinante humane Zytokine:
(GM-CSF, IL-1β, IL-4, IL-6, TNF-α)

Stocklösung: 100 µg/ml
Rekonstitution in PBS (-/-) + 0,1 % BSA

Reifung dendritischer Zellen – Fortsetzung

Lösen durch langsames Schwenken
Wiederholte Einfrier-/ Auftau-Zyklen vermeiden
Bei -20 °C bis -80 °C 3 Monate haltbar

Prostaglandin E2:

Stocklösung: 10 mg/ml
Rekonstitution in absolutem Ethanol
Lagerung lichtgeschützt bei 2-8 °C

Proinflammatorischer Cocktail:

IL-1 β	[10 ng/ml]
IL-6	[10 ng/ml]
TNF- α	[10 ng/ml]
PGE2	[1 μ g/ml]

Frisch ansetzen

Generierung und Kultivierung der moDCs / Kokulturen / MLRKomplettmedium:

1 \times RPMI 1640 (mit L-Glutamin und Phenolrot)
10 % FCS
1 x Nichtessentielle Aminosäuren
Natriumpyruvat [1 mM]
L-Glutamin [2 mM]
 β -Mercaptoethanol [50 μ M]
Primocin [100 μ g/ml]

Cytokine Release Assay – PBMC-MethodeKultivierungsmedium:

1 \times RPMI 1640 (mit L-Glutamin und Phenolrot)
2 % FCS

SubstanzenConcanavalin A (ConA):

Stocklösung: 1 mg/ml
Rekonstitution in PBS (-/-)
Lagerung bei -20 °C

Substanzen – FortsetzungImject™ Mariculture KLH (Pierce Biotechn.):

Stocklösung: 10 mg/ml
Rekonstitution in sterilem *A.bidest*, 30 Min. auf Eis lösen lassen
Mit / ohne Dialyse
Lagerung bei -20 °C

Dialyse:

Die Dialyse erfolgt nach Herstellerangabe (bei 4 °C gegen PBS) mittels der Dialyse Kassette Slide-A-Lyzer® G2, 3.5K MWCO, 15 ml (Thermo Fisher Scientific):
Zweimal für je zwei Stunden, einmal ü.N. dialysieren
Zentrifugation: 30 Min., 1000 \times g, 4 °C
Die Proteinkonzentration des dialysierten KLHs wurde mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits überprüft

Keyhole Limpet Hemocyanin aus *Megathura crenulata* (Sigma-Aldrich):

Stocklösung: 10 mg/ml
Rekonstitution in sterilem *A.bidest*
Bei 2-8 °C 2 Wochen haltbar
Bei -20 °C 2 Monate haltbar

Lipopolysaccharid (LPS):

Stocklösung: 5 mg/ml
Rekonstitution in PBS (-/-)
Lagerung bei -20 °C

Ovalbumin (OVA) (Sigma-Aldrich):

Stocklösung: 5 mg/ml
Rekonstitution von 0,005 g in 1 ml 1 \times RPMI
Frisch ansetzen

Ovalbumin (OVA), EndoGrade® (Hyglos):

Stocklösung: 2,5 mg/ml
Rekonstitution in hochreinem Wasser (EndoGrade®)
Wiederholte Einfrier-/ Auftau-Zyklen vermeiden
Bei -20 °C 6 Monate haltbar

Remicade®, Infliximab:

Stocklösung: 10 mg/ml
Rekonstitution in sterilem *A.bidest*

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellkultur

2.2.1.1 Isolation humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Zur Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*; PBMCs) wurde humanes Spenderblut von unterschiedlichen Quellen bezogen (Kap. 2.1.9, Tab.6). Für die Experimente zur Etablierung der Kokultur, der erweiterten Kokultur sowie für die MLR wurden *Buffy Coats* freiwilliger Spender (nach erfolgter Einwilligung) genutzt, welche vom Deutschen Roten Kreuz (DRK) bezogen wurden.

Für die Etablierung des *Cytokine Release Assays* wurde Vollblut freiwilliger Spender vom *Clinical Research Service* - Forschungsinstitut in Wuppertal verwendet.

Die Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut erfolgt durch eine Auftrennung der Blutbestandteile über ein Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer. Hierbei handelt es sich um Biocoll mit einer spezifischen Dichte von 1,077 g/ml. Wird das Blut über dieses hydrophile Polymer geschichtet und mit hoher Umdrehungszahl zentrifugiert, entsteht aufgrund unterschiedlicher Dichten eine charakteristische Auftrennung der Blutbestandteile (Abb. 8). So bilden die mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) die Interphase zwischen dem thrombozytenreichen Serum und dem Biocoll, während Granulozyten und Erythrozyten auf den Grund des Reaktionsgefäßes sedimentieren.

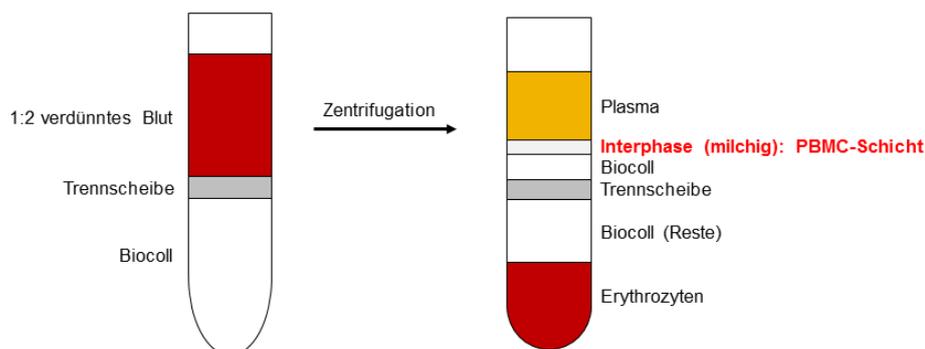


Abbildung 8: Prinzip der Biocoll-Dichtegradientenzentrifugation. Nach Schichtung des Blutes über Biocoll und anschließender Dichtegradientenzentrifugation befinden sich die Zellen, die eine höhere Dichte als Biocoll aufweisen, am Boden des Zentrifugenröhrchens. Die mononukleären Zellen hingegen bilden eine Interphase zwischen dem thrombozytenreichen Plasma und Biocoll.

Nach Bereitstellung wird das Blut innerhalb von vier Stunden (Lagerung bei RT) auf Falcons verteilt und 1:2 mit $1\times$ RPMI (RT) verdünnt. Anschließend werden etwa je 15-30 ml des verdünnten Blutes auf Leucosep-Röhrchen verteilt, die mit 15 ml Biocoll-Trennlösung befüllt sind. Eine Trennscheibe verhindert das Mischen der beiden Lösungen (Zentrifugation: 2 Min.,

400 × g, RT). Es folgt eine 20-minütige Zentrifugation bei 1000 × g, RT, ohne Bremse. Anschließend wird die milchige Interphase (angereicherte PBMC-Schicht) zwischen Plasma und Trennlösung abgenommen und dreimal mit kaltem Waschmedium gewaschen (Zentrifugationen: 1.) + 2.) 10 Min. bei 300 × g; 3.) 10 Min. bei 200 × g), um Thrombozyten und Reste der Biocoll-Trennlösung herauszuwaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird der Überstand abgenommen, das Pellet in 1× RPMI resuspendiert und die Gesamtzellzahl in Trypanblau unter Ausschluss der Erythrozyten mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die gewonnenen PBMCs werden direkt für folgende Experimente eingesetzt oder kryokonserviert (Kap.2.2.1.3).

2.2.1.2 Zellzahlbestimmung

2.2.1.2.1 Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer

Nach Zellisolationen oder -revitalisierungen erfolgt die Ermittlung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Hierzu wird ein Aliquot der Zellsuspension 1:10 mit Trypanblau (1:10 in PBS verdünnt) versetzt, um tote Zellen anzufärben und so die Lebendzellzahl ermitteln zu können. Die Zellzahlbestimmung erfolgt durchlichtmikroskopisch mittels Zellzählung von mindestens 100 vitalen Zellen.

2.2.1.2.2 Konduktometrische Zellzahlbestimmung

Für die Kokultivierung von DCs mit autologen T-Zellen werden die Zellzahlen der generierten, stimulierten und geernteten DCs konduktometrisch mit Hilfe des *Coulter Counter® Multisizer™3* bestimmt. Das Prinzip zur Zellzählung und Zellgrößenbestimmung beruht auf dem Impedanzmessverfahren. Es wird die Änderung der elektrischen Leitfähigkeit zwischen zwei Elektroden gemessen, zwischen denen, durch Anlegen eines elektrischen Feldes, ein elektrischer Strom fließt. Dieser Bereich bildet die Messzone. Zur Zellzahlbestimmung strömen die Zellen in einer niedrig konzentrierten Elektrolytlösung durch eine Kapillaröffnung und passieren diese Messzone. Durch die geringe Leitfähigkeit der Zellen erhöht jede passierende Zelle kurzzeitig den Widerstand, was als Spannungsimpuls gemessen werden kann. Die Anzahl der gemessenen Impulse bildet die Konzentration der Zellen in der Probe ab. Die Höhe des Spannungsimpulses ist proportional zur Größe der Zelle. Mit dem Multisizer können so Zellen und Partikel von 0,4 µm bis 1200 µm gezählt werden. Für die Zellzahlbestimmung der DCs wird ein Messbereich von 5 µm bis 20 µm definiert.

Für die konduktometrische Zellzahlbestimmung werden 40 µl der Einzelzellsuspension 1:500 mit *ISOTON® II* verdünnt. Zur Lyse eventuell vorhandener Erythrozyten wird etwa eine Minute vor dem Messvorgang 60 µl *Zap-O-Globin* hinzugefügt.

2.2.1.3 Kryokonservierung und Revitalisierung von Primärzellen

Für die Kryokonservierung werden die Zellen auf das Zweifache der gewünschten Zellzahl/ml in FCS eingestellt und langsam mit gleichem Volumen an eiskaltem Einfriermedium (Verhältnis 1:1) versetzt, wodurch sich eine finale Konzentration von 10 % DMSO ergibt. Die Zellsuspension wird in Kryoröhrchen überführt und mit Hilfe eines *Mr.Frosty*TM-Einfriergerätes auf -80 °C heruntergekühlt. Nach etwa 24 Stunden werden die Kryoröhrchen zur Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff transferiert.

Zum Auftauen der Zellen werden die im flüssigen Stickstoff gelagerten Kryoröhrchen in einem auf 37 °C vorgewärmtem Wasserbad schnell angetaut. Kurz vor dem vollständigen Auftauen werden die Zellen in 10 ml des vorgewärmten 1×RPMI überführt und 10 Minuten bei 400 × g und 4 °C zentrifugiert. Nach Wiederholung dieses Waschschrilles erfolgt die Bestimmung der Gesamtzellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (Kap. 2.2.1.2.1).

2.2.1.4 Magnetische Zellseparation

Die Expression charakteristischer Oberflächenantigene kann zur Isolierung einzelner Zellpopulationen genutzt werden (Miltyeni *et al.*, 1990; Radbruch *et al.*, 1994). Bei der magnetischen Zellseparation (*magnetic-activated cell sorting*; MACS) werden kleine paramagnetische Partikel verwendet, die mit Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmoleküle beschichtet sind (*MicroBeads*). Mit Hilfe dieser antikörperbeschichteten Partikel werden die Zellen markiert und auf Trennsäulen aus plastikumhüllten magnetischen Fasern im magnetischen Feld eines *autoMACS*[®] Separators (Kapazität: 1×10^9 Zellen) separiert. Zellen, die aufgrund ihrer Expression des spezifischen Oberflächenmoleküls zuvor die magnetpartikelgekoppelten Antikörper gebunden haben, werden durch das magnetische Feld in der Säule zurückgehalten. Unmarkierte Zellen ohne passende Oberflächenmoleküle passieren diese und werden ausgewaschen. Die markierten Zellen werden nach Auflösung des Magnetfeldes eluiert und können für weitere Untersuchungen eingesetzt werden.

CD14⁺ Monozyten und CD4⁺ T-Lymphozyten werden mittels MACS separiert. Als Quelle für Monozyten und CD4⁺ Zellen dienen sowohl kommerziell erworbene als auch aus humanem Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnene PBMCs. CD4⁺ Zellen können direkt aus PBMCs oder aus der CD14-negativen Zellfraktion der PBMCs, nach Isolation der Monozyten, gewonnen werden. Bei der verwendeten „positiven Selektion“ stellen die von dem Magnetfeld zurückgehaltenen Zellen die Zielzellen dar. Die Durchführung erfolgt nach den Angaben des Herstellers für die jeweils verwendeten *MicroBeads* (Miltyeni Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland). Laut Herstellerangaben haben die an die Zielzellen gekoppelten *MicroBeads* keinen Einfluss auf den Aktivierungsstatus der Zielzellen. Die Positivfraktionen werden bis zur

Weiterverarbeitung in Kompletmedium auf Eis gelagert. Der Separationserfolg und die Reinheit der separierten Zellen werden durch Anfärben der gewonnenen Zellfraktionen mit fluorochromgekoppelten anti-CD14 bzw. anti-CD4 Antikörpern durchflusszytometrisch überprüft.

2.2.1.5 Durchflusszytometrische Zellpopulationsanalyse

Die Durchflusszytometrie basiert auf der Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenzen und ermöglicht eine Charakterisierung und Quantifizierung der Eigenschaften verschiedener Zellpopulationen (*fluorescence-activated cell sorting*; FACS). Hierzu werden die Zellen mit spezifischen, fluorochromkonjugierten Antikörpern markiert, welche gegen bestimmte Oberflächenantigene gerichtet sind. Des Weiteren können Zellen mit fluoreszierenden Zellfarbstoffen markiert werden, welche beispielsweise in die Lipidregion der Zellmembran inkorporiert werden (z.B. PKH26) oder als Vitalfarbstoff fungieren und in Zellen mit nicht intakter Zellmembran eindringen und in die DNA interkalieren (z.B. 7-AAD oder Propidiumiodid).

Bei der durchflusszytometrischen Analyse fließt die zu analysierende Zellsuspension durch eine dünne Küvette und wird dort durch einen laminaren Hüllstrom fokussiert, sodass ein Probenstrahl einzelner Zellen entsteht (hydrodynamische Fokussierung, Abb. 9). Die Zellen passieren einzeln die Messzelle und werden dort von einem Laser erfasst. Jede Zelle verursacht dabei Streulicht, welches von Photodetektoren erfasst wird. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*; FSC) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel zum Laserlicht (Detektor liegt in derselben Achse wie der Laserstrahl) und dient folglich der Bestimmung der Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*; SSC) hingegen ist ein Maß für die Lichtbrechung im Winkel von 90° und somit für die Granularität der Zellen.

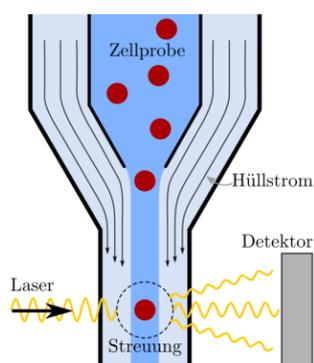


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Prinzips der hydrodynamischen Fokussierung bei der durchflusszytometrischen Analyse. Die zu analysierende Zellprobe wird durch einen laminaren Hüllstrom hydrodynamisch fokussiert, sodass die Zellen einzeln den optischen Messpunkt passieren. Das Streulicht und die Fluoreszenzemissionen werden von Photodetektoren erfasst und geben Rückschluss auf die Eigenschaften der Zellen. (Quelle: <https://www.ptb.de/cms/ptb/fachabteilungen/abt8/fb-84/ag-841/flowzytometrie-841.html> [02.05.2018])

Zusätzlich werden die Fluoreszenzen angeregt und die Emission der verschiedenen Fluorochrome erfasst. Über die Bindung der markierten Antikörper ermöglicht dies Aussagen über Zelleigenschaften, wie unter anderem die Expressionsrate bestimmter Oberflächenmoleküle. Das resultierende Streu- und Fluoreszenzlicht wird über das optische

System zu den verschiedenen Detektoren geleitet und dort in elektronische Signale umgewandelt (Abb. 10).

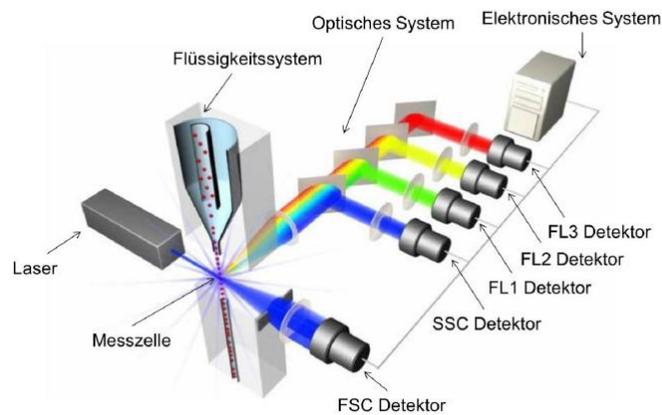


Abbildung 10: Aufbau eines Durchflusszytometers. Die Zellsuspension wird über ein Flüssigkeitssystem in die Messzelle transportiert und fokussiert. Die einzelnen Zellen werden von einem Laserstrahl erfasst. Das resultierende Streu- und Fluoreszenzlicht wird über das optische System zu den verschiedenen Detektoren geleitet und in elektronische Signale umgewandelt. (Quelle: http://www.uni-salzburg.at/fileadmin/oracle_file_imports/2081233.PDF 02.05.2018])

Durch die Analyse einer großen Anzahl von Zellen (5.000 - 10.000 *events*) innerhalb eines sehr kurzen Zeitintervalls (>1000 Zellen/s) können schnell repräsentative Informationen über Zellpopulationen gewonnen werden.

Für die durchflusszytometrischen Analysen werden $2 - 10 \times 10^5$ Zellen in FACS-Röhrchen überführt, mit je 1 ml 0,02 % PBS-Azid gewaschen (Zentrifugation: 10 Min., $300 \times g$, 4°C) und der Überstand verworfen. Für jede Färbung wird ein Mastermix, bestehend aus den einzelnen Antikörpern in zuvor austitrierter Konzentration, in Färbepuffer (0,02 % PBS-Azid) hergestellt. Die verwendeten Antikörper sind in Kapitel 2.1.3 zusammengefasst. Pro FACS-Röhrchen wird das Zellpellet mit 100 μl der angesetzten Antikörperlösung resuspendiert und für 20-30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Proben mit jeweils 1 ml PBS gewaschen (Zentrifugation: 10 Min., $300 \times g$, 4°C), der Überstand verworfen und die Zellen in 200 μl PBS-Azid aufgenommen. Die Aufnahme und Analyse der Proben erfolgt am *FACSCanto™ II*. Die Zellen werden im FCS/SSC hinsichtlich ihrer Lichtstreuungseigenschaften aufgenommen und anhand ihrer Fluoreszenzmarkierung durch verschiedene *Gating*-Strategien auf die zu analysierenden Subpopulationen eingegrenzt. Da verschiedene Fluorochrome Überlagerungen in ihren jeweiligen Emissionsspektren zeigen können, wird diese, wenn nötig, durch eine spektrale Kompensation elektronisch subtrahiert. Somit werden sowohl falsch positive als auch falsch negative Ergebnisse vermieden. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der *FACSDiva™* Software in Form von Histogrammen und Punktdiagrammen (*dot plots*) in Abhängigkeit von der Anzahl der zu betrachtenden Parameter.

2.2.2 Generierung und Charakterisierung humaner dendritischer Zellen

2.2.2.1 Generierung dendritischer Zellen aus humanen Monozyten

Für die Generierung von DCs dienen Monozyten als Ausgangszellpopulation, welche zuvor aus PBMCs mittels magnetischer Zellseparation (Kap. 2.2.1.4) gewonnen wurden. Nach magnetischer Zellseparation der CD14⁺ Monozyten werden diese in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in Wells einer 24-Well-Platte in Kompletmedium, unter Zugabe von 55 ng/ml GM-CSF und 30 ng/ml IL-4, für insgesamt sechs Tage kultiviert. Nach 24 bis 48 Stunden wird das gleiche Volumen Kompletmedium zugegeben und die Zytokine erneut in den gleichen finalen Konzentrationen wie zu Beginn der Kultur zugesetzt. Als Negativkontrolle werden Monozyten-Kulturen ohne Zytokinstimulus mitgeführt. An Tag 6 werden die Zellen je eines Wells der differenzierten Monozyten-abgeleiteten DCs (*monocyte-derived DCs*; moDCs) und der undifferenzierten Monozyten geerntet, indem nicht-adhärenente Zellen zunächst mit BSA- und Natriumazid-haltigem PBS (*autoMACS® Running Buffer*, Miltenyi) abgespült werden. Die adhärenenten Zellen werden mit einem EDTA-haltigen Puffer (*autoMACS® Rinsing Solution*, Miltenyi) für 15 Minuten unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert und ebenfalls geerntet. Nach durchlichtmikroskopischer Kontrolle der Wells werden diese nochmals mit PBS abgespült. Alle Zellen eines Wells, nicht-adhärenent und adhärenent, werden anschließend in einem Falcon gesammelt und anhand der Oberflächenmarker CD14 und CD11c durchflusszytometrisch charakterisiert, um den Differenzierungserfolg sicherzustellen.

2.2.2.2 Messung der Endozytose

Die Messung der Endozytose beruht auf der durchflusszytometrischen Analyse der Akkumulation von Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten Molekülen in den Zellen. Der Test auf Endozytose wird sowohl mit undifferenzierten Monozyten (Tag 0) als auch mit sich zu DCs differenzierenden Zellen, zu unterschiedlichen Zeitpunkten, durchgeführt. Während der Differenzierung werden die Zellen an Tag 1, 2, 5 und 6 mittels Zellschaber geerntet, in 1×10^6 RPMI mit 10 % FCS auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und in FACS-Röhrchen überführt (je 100 µl Zellsuspension/Röhrchen). Pro Ansatz werden drei FACS-Röhrchen angesetzt, wobei zwei als Negativkontrolle dienen. Eine dieser Negativkontrollen wird zunächst für 60 Minuten bei 0 °C (auf Eis) gehalten. Die restlichen Proben werden unter Standardbedingungen im Inkubator gelagert. Vor Gebrauch werden die FITC-markierten Dextran- bzw. OVA-Moleküle (DX-FITC bzw. OVA-FITC) zentrifugiert (5 Min., 12 000 x g, RT), um mögliche Aggregate zu entfernen. Es folgt die Inkubation der Zellen mit den FITC-markierten Molekülen in einer finalen Konzentration von 0,5 mg/ml für 30 Minuten unter Standardbedingungen bzw. bei 0 °C

(Negativkontrolle). Die Inkubation der zweiten Negativkontrolle erfolgt ohne Zugabe von FITC-markierten Molekülen. Im Anschluss werden die Proben dreimal mit je 1 ml kaltem Waschmedium gewaschen (Zentrifugation: 10 Min., 300 × g, 4 °C). Die durchflusszytometrische Analyse der Akkumulation der FITC-markierten Moleküle in den Zellen erfolgte am *FACSCanto™ II*. Die Akkumulation wird aus der Differenz der prozentualen Anteile FITC-positiver Zellen der Proben bei Inkubation bei 37 °C und 0 °C (Negativkontrolle) berechnet.

2.2.2.3 Anfertigung von Zytospins und Färbung nach Pappenheim

Zur Anfertigung von Zytospins aus Einzelzellsuspensionen werden die Zellen durch geringe Zentrifugalkräfte (4 Min., 400 rpm) mittels einer *Cytospin™*-Zentrifuge als Zytospots in einem Monolayer auf Objektträger aufgebracht. Je Zytospot werden 1×10^5 Monozyten oder moDCs in 200 µl PBS (+ 10 % FCS) über eine Einweg-Probenkammer (*Cytofunnel*) punktuell auf einen Objektträger sedimentiert. Pro Objektträger werden zwei Spots erstellt. Nach dem Trocknen werden diese für sieben Minuten in einem Gemisch aus Aceton und Methanol (Verhältnis 3:2) fixiert. Nach erneuter Trocknung erfolgt die Färbung nach Pappenheim:

May-Grünwald-Lösung	5 Min.
PBS +/-	2 Min.
Giemsa-Lösung (1:20 in Weise-Puffer)	15 Min.
<i>A. dest.</i>	waschen

Das positiv geladene Methylenblau in der Färbelösung bindet an negativ geladene Zellbestandteile, wie Nukleinsäuren im Zellkern, und färbt diese blau. Basische Zellbestandteile wie Granula hingegen werden durch Eosin orange-rot gefärbt.

2.2.2.4 Reifung dendritischer Zellen

Die spezifische Reifung mit den jeweiligen Substanzen (Tab. 7) erfolgt ohne erneutes Ernten und Aussäen der Zellen nach deren Differenzierung zu moDCs. An Tag 6 werden 200 µl des Mediums gewechselt und das Volumen im Well um ein Viertel der ursprünglichen Menge, ohne Zugabe weiterer Zytokine, aufgestockt (finales Volumen: 2,5 ml/Well). Es folgt die spezifische Reifung der moDCs durch Zugabe der jeweiligen Substanz für 48 Stunden. Als Negativkontrolle dienen moDCs, welche an Tag 6 nur mit Kompletmedium, ohne Substanzgabe, behandelt werden. Diese werden im Folgenden als „unreife moDCs“ betitelt.

An Tag 8 werden die Zellen geerntet (analog zu Tag 6, Kap. 2.2.2.1), gezählt, durchflusszytometrisch charakterisiert (7-AAD, CD11c, CD80, CD83, CD86, CD209, CD40, HLA-DR) und für die Kokultur mit autologen T-Lymphozyten eingesetzt.

Tabelle 7: Eingesetzte Positivkontrollen, Modell-Antigene und monoklonale Antikörper zur spezifischen Reifung von moDCs. Details zu den verwendeten mAk siehe Kap. 2.1.5, Tab. 5.

Positivkontrollen	Modell-Antigene	Monoklonale Antikörper
TNF- α	KLH Sigma	OKT3
LPS	KLH Merck	MabThera (Rituximab)
Cocktail, proinflammatorisch (IL-1 β , TNF- α , IL-6, PGE2)	KLH Pierce	Arzerra (Ofatumumab)
	KLH Pierce, dialysiert	Remicade (Infliximab)
	OVA Sigma	Humira (Adalimumab)
	OVA Hyglos	

2.2.3 *In vitro* Kokulturen humaner immunkompetenter Zellen

Im Rahmen der *in vitro* Kokulturen wird die Induktion einer Immunantwort in Form einer T-Zell-Aktivierung untersucht. Hierfür werden CD4⁺ T_H-Zellen mit humanen immunkompetenten Zellen (autologe, spezifisch gereifte moDCs bzw. allogene PBMCs) über definierte Kultivierungsdauern kokultiviert und analysiert.

2.2.3.1 Proliferationstest mittels PKH26-Membranmarkierung

Die Analyse der Proliferation von CD4⁺ T_H-Zellen erfolgt mit Hilfe des PKH26 *Red Fluorescent Cell Linker* Mini Kits (Sigma-Aldrich) und basiert auf dem stabilen Einbau des lipophilen, gelb-orange fluoreszierenden Farbstoffes PKH26 in die Lipidregion der Zellmembran. Während die Fluoreszenzintensität in sich nicht teilenden Zellen über Wochen bis Monate (bis zu 100 Tagen nach Herstellerangaben) stabil bleibt, verteilt sich der Farbstoff mit jeder Zellteilung weiter auf die Tochterzellen. Die Fluoreszenzintensität nimmt somit mit zunehmender Zellproliferation ab. Diese Verdünnung des Farbstoffes wird sich bei der durchflusszytometrischen Analyse der Proliferation zunutze gemacht. CD4⁺ Zellen werden entweder kommerziell erworben oder mittels magnetischer Zellseparation aus der CD14-negative Zellfraktion der PBMCs, nach Isolation der Monozyten, gewonnen. Nach Revitalisierung bzw. Zellseparation werden die zu markierenden Zellen in serumfreien Medium gewaschen und in einem Diluenten (im Kit enthalten) auf 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. Die Markierung der Zellen erfolgt nach einem minimal modifizierten Protokoll des Herstellers. Die Inkubationszeit der Zellen mit dem Farbstoff beträgt vier Minuten. Nach dem Stoppen der Färbung durch eine einminütige Inkubation mit FCS erfolgt direkt, ohne vorangegangene Zentrifugation, die Zugabe von Komplettmedium, wodurch das Volumen im Falcon verdoppelt wird. Erst jetzt folgt die Zentrifugation, entsprechend des Herstellerprotokolls. Die Anzahl der folgenden Waschschrte wurden auf zwei reduziert. Dieses modifizierte Protokoll reduziert Zellverluste auf ein Minimum. Für eine anschließende Kokultur mit autologen

moDCs werden die gefärbten CD4⁺ T-Zellen in Kompletmedium auf eine Konzentration von 2×10⁶/ml eingestellt.

2.2.3.2 Kokultivierung dendritischer Zellen mit autologen T-Lymphozyten

Um *in vitro* eine primäre Immunantwort zu induzieren, werden spezifisch gereifte moDCs (Kap. 2.2.2.4) mit autologen, PKH26-markierten CD4⁺ T_H-Zellen (Kap. 2.2.3.1) in Kokultur gebracht. Die sechstägige Kokultivierung erfolgt in 96-Well-Flachbodenplatten in einem Zellzahlverhältnis von moDCs zu T-Zellen von 1:10 (2×10⁵/ml: 2×10⁶/ml) und einem finalen Volumen von 200 µl/Well, unter zusätzlichem Antigenstimulus in löslicher Form zum Start der Kokultur. Als Kontrollansatz dienen Kokulturen von T_H-Zellen mit unreifen moDCs. Um die Vitalität der T-Zellen sicherzustellen, werden zusätzlich Monokulturen der CD4⁺ Zellen mit und ohne Concanavalin A (ConA)-Stimulus (4 µg/ml) mitgeführt. Die Monokultur unstimulierter CD4⁺ Zellen dient darüber hinaus der Festlegung des *Gates* bei der durchflusszytometrischen Analyse, um eine optimale Messung der Verdünnung des Farbstoffes und somit der Proliferation zu gewährleisten. Pro Ansatz werden mindestens Duplikate, optimalerweise Triplikate, angesetzt. Die Anzahl verfügbarer T-Zellen ist hier der limitierende Faktor. An Tag 1, 4 und 5 erfolgt jeweils ein Mediumwechsel von 25 % des Gesamtvolumens (50 µl) mit frischem Kompletmedium, um die Nährstoffversorgung der Zellen über die gesamte Kultivierungsdauer zu gewährleisten und die Vitalität der Zellen aufrecht zu erhalten. Aliquots der Überstände (inklusive eines Aliquots von Tag 6) werden für spätere optionale Zytokinanalysen bei -80 °C aufbewahrt. Am Ende der Kultivierungsdauer werden die Zellen nach 15-minütiger Inkubation mit EDTA-haltigem Puffer geerntet (Kap. 2.2.2.1) und durchflusszytometrisch auf eine induzierte T-Zell-Proliferation und die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 analysiert.

Im Rahmen der erweiterten Kokultur steht anstelle der Analyse der Proliferation und der CD25-Expression eine Analyse der induzierten Zytokinsekretionen im Vordergrund. Spezifisch KLH-gereifte moDCs werden hier mit autologen, unmarkierten CD4⁺ T_H-Zellen über einen Zeitraum von 16 Tagen kokultiviert. Die Zellen der Kokultur werden zweimal im Abstand von einer Woche mit frisch generierten, KLH-gereiften moDCs desselben Donors restimuliert (Tag 7 und 14; +/- lösliches KLH). Die Zellzahl der zur Restimulation eingesetzten moDCs entspricht einem Viertel der an Tag 0 eingesetzten moDCs (5×10³/60 µl). Insgesamt kommen die T-Zellen somit dreimal mit dem jeweiligen Antigen (KLH) in Kontakt. Darüber hinaus wird im Rahmen der erweiterten Kokultur der Einfluss der zusätzlichen Gabe des Antigens in löslicher Form zum Start der Kokultur und zu den Zeitpunkten der zellulären Restimulationen untersucht. Eine Abweichung dieses Schemas stellt die Restimulation an Tag 14 mit einem zuvor für diesen Ansatz irrelevanten Antigen dar. Hierzu werden die moDCs mit dem Modell-Antigen OVA gereift und an Tag 14 mit zusätzlichem löslichen OVA zur Kokultur gegeben. Dieser Ansatz stellt eine erste

Kontrolle der Spezifität der Reaktionen auf das Antigen KLH dar. Weitere Kontrollansätze bilden Monokulturen von sowohl spezifisch KLH-gereiften moDCs als auch von CD4⁺ T_H-Zellen. Beide Ansätze werden zu den definierten Zeitpunkten ebenfalls restimuliert: moDCs durch weitere KLH-gereifte moDCs (+ lösliches KLH) und die T-Zell-Monokulturen durch lösliches KLH, aber ohne zellulären Stimulus durch spezifisch gereifte moDCs. Die Nährstoffversorgung wird durch einen täglichen Mediumwechsel von 30 % des Gesamtvolumens (60 µl) gewährleistet, wobei jeweils Aliquots der Überstände (inklusive eines Aliquots von Tag 16) für spätere Zytokinanalysen (Kap. 2.2.7) bei -80 °C aufbewahrt werden.

2.2.3.3 Gemischte Lymphozytenreaktion

Bei der gemischten Lymphozytenreaktion (*mixed lymphocyte reaction*; MLR) werden PKH26-markierte CD4⁺ T_H-Zellen mit allogenen PBMCs kokultiviert. Die PBMCs stellen die Stimulator-, die CD4⁺ T-Zellen die *Responder*-Zellpopulation dar.

2.2.3.3.1 Mitomycin C-Behandlung der Stimulator-Zellpopulation

Für die Ermittlung der einzusetzenden Mitomycin C (MitC)-Konzentration zur optimalen Inhibierung der Proliferation der Stimulator-Zellpopulation werden PBMCs mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26 inkubiert (Kap. 2.2.3.1) und mit unterschiedlichen Konzentrationen MitC (0 – 100 µg/ml) behandelt. Zur Analyse der MitC-induzierten Zellinhibierung erfolgt im Anschluss eine Stimulation mit dem Mitogen ConA (Andersson *et al.*, 1972; Dwyer und Johnson, 1981).

PBMCs werden in 1×RPMI auf die gewünschte Zellzahl eingestellt ($1 - 6 \times 10^7$ Zellen/ml) und in einem finalen Volumen von 2 ml für 25 Minuten unter Standardbedingungen mit den jeweiligen Konzentrationen MitC inkubiert. Im Anschluss werden die Proben dreimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation: 10 Min., $300 \times g$, 4 °C). Pro Well werden 1×10^6 PBMCs/ml in einem finalen Volumen von 200 µl auf 96-Well-Flachbodenplatten, mit und ohne ConA-Stimulation (2 µg/ml; 4 µg/ml), für vier Tage in Kompletmedium kultiviert. Pro Ansatz werden Triplikate angesetzt. Als Negativkontrolle dienen unbehandelte Zellen (ohne MitC, ohne ConA). Am Ende der Kultivierungsdauer werden die Zellen geerntet und durchflusszytometrisch auf ihre Proliferation analysiert. Für folgende Experimente der MLR wurde eine MitC-Konzentration von 75 µg/ml zur Inhibierung der Proliferation allogener PBMCs eingesetzt.

2.2.3.3.2 Klassische und erweiterte MLR

Im Rahmen der „klassischen MLR“ erfolgt eine sechstägige Kokultivierung von PKH26-markierten CD4⁺ T-Zellen mit allogenen, MitC-behandelten PBMCs in unterschiedlichen

Zellzahlverhältnissen, sowohl auf 96-Well-Flachboden- als auch auf Rundbodenplatten. Hierbei werden T-Zellen in einer Zellzahl von 1×10^5 /100 μ l mit PBMCs variierender Zellzahlen (1×10^5 , 2×10^5 , 5×10^5 , 10×10^5 /100 μ l) in einem finalen Gesamtvolumen von 200 μ l Kompletmedium kokultiviert. Zur Überprüfung der Vitalität der Zellen dienen ConA-stimulierte (4 μ g/ml) Monokulturen von CD4⁺ T-Zellen als Positivkontrolle. Zur Bestimmung der Hintergrundproliferation werden darüber hinaus unstimulierte Monokulturen von T-Zellen und PKH26-markierten, MitC-behandelten PBMCs mitgeführt. An Tag 1, 3 und 5 erfolgt ein Mediumwechsel von 25 % des Gesamtvolumens (50 μ l) mit frischem Kompletmedium, um die Nährstoffversorgung der Zellen über die gesamte Kultivierungsdauer zu gewährleisten und die Vitalität der Zellen aufrecht zu erhalten. Am Ende der Kultivierungsdauer werden die Zellen geerntet und durchflusszytometrisch auf eine induzierte Proliferation und CD25-Expression analysiert.

Die „erweiterte MLR“ ist eine verlängerte klassische MLR. PKH26-markierte CD4⁺ T-Lymphozyten werden mit allogenen, MitC-behandelten PBMCs in einem Verhältnis von 1:2 (1×10^5 T-Zellen: 2×10^5 PBMCs / 200 μ l) für eine Kultivierungsdauer von 12 Tagen auf 96-Well-Flachbodenplatten kokultiviert. Die T-Zellen der „erweiterten MLR“ werden an Tag 6 der Kultur mit weiteren allogenen, MitC-behandelten PBMCs restimuliert (Abb. 11D). Die Zellzahl der zur Restimulation eingesetzten PBMCs entspricht einem Viertel der ursprünglichen Zellzahl an PBMCs zu Beginn der MLR. Als Kontrollansätze dienen eine klassische MLR über eine Kultivierungsdauer von sechs und 12 Tagen (Abb. 11A, B) und eine Monokultur der PBMCs, welche an Tag 6 für eine Restimulation der T-Lymphozyten eingesetzt wurden (Abb. 11C).

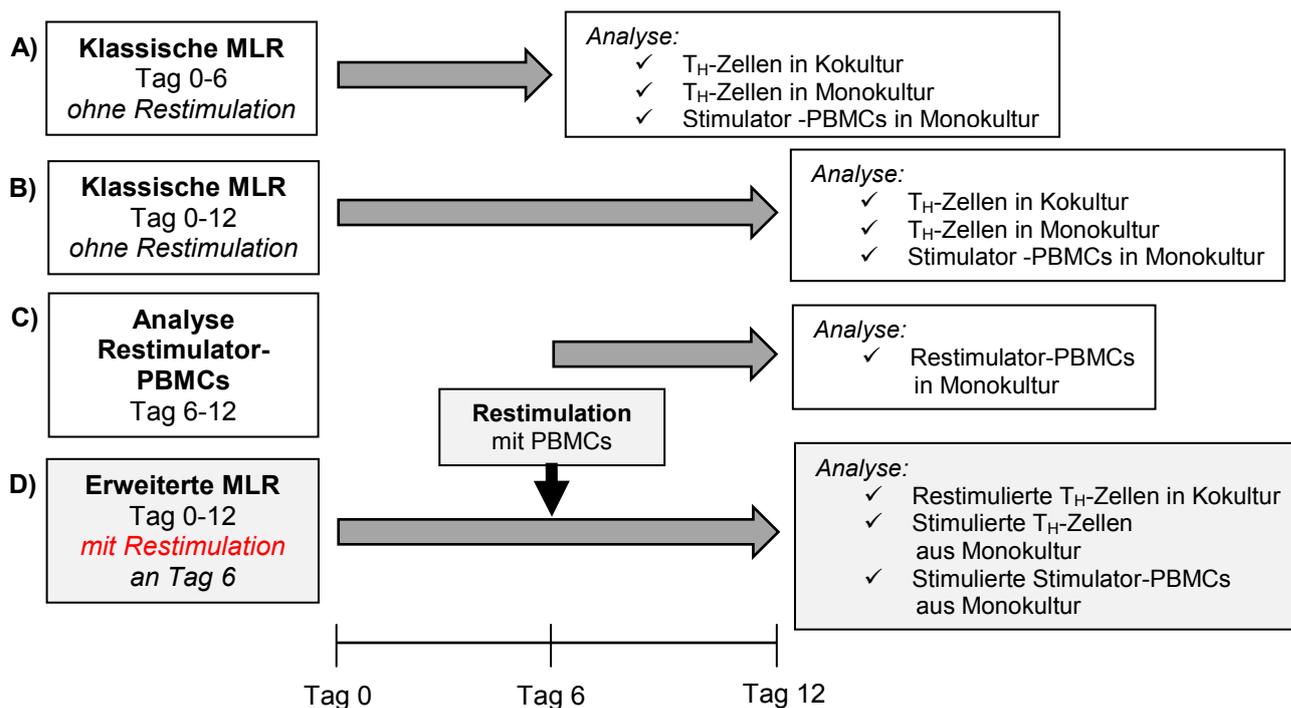


Abbildung 11: Schema der Ansätze und analysierten Endpunkte der erweiterten MLR zur *in vitro* Stimulation von T-Lymphozyten. A) Klassische MLR über sechs Tage (Tag 0 - 6). B) Klassische MLR über 12 Tage (Tag 0 - 12). C) Analyse der Monokultur von allogenen PBMCs für die Restimulation an Tag 6 im Rahmen der erweiterten MLR (Tag 6 - 12). D) Erweiterte MLR über 12 Tage (Tag 0 - 12). Bei der erweiterten MLR werden die Zellen für eine verlängerte Kultivierungsdauer von 12 Tagen kokultiviert. An Tag 6 erfolgt eine wiederholte Stimulation mit weiteren allogenen PBMCs. A-C stellen somit Kontrollansätze zur erweiterten MLR dar. Innerhalb aller Ansätze dienen mitgeführte Monokulturen der einzelnen Zelltypen der Kontrolle.

Innerhalb der Ansätze der klassischen (Abb. 11A, B) und der erweiterten MLR (Abb. 11D) erfolgt neben der Analyse der T_H-Zellen aus den jeweiligen Kokulturen auch die Analyse von T_H-Zell- und Stimulator-PBMC-Monokulturen zur Bestimmung der Hintergrundproliferation. Es ist zu beachten, dass diese Ansätze der Monokulturen im Rahmen der erweiterten MLR an Tag 6 der Kultur ebenfalls den Stimulus durch die Zugabe allogener PBMCs erhalten. Zur Überprüfung der Zellvitalität dienen ConA-stimulierte (2 µg/ml) Monokulturen von CD4⁺ T-Zellen als Positivkontrolle. Pro Ansatz werden mindestens Duplikate angesetzt. Auch hier ist die Anzahl verfügbarer T-Zellen der limitierende Faktor. Die Nährstoffversorgung wird durch einen Mediumwechsel von 25 % des Gesamtvolumens (50 µl) an den Tagen 2, 5, 7, 9 und 11 gewährleistet. An Tag 6 werden 50 % des Gesamtvolumens (100 µl) im Zuge der Restimulation ausgetauscht. Die durchflusszytometrische Analyse der Proliferation und CD25-Expression erfolgt an Tag 6 und 12 (klassische MLR) und an Tag 12 (erweiterte MLR, Restimulation an Tag 6).

2.2.4 Cytokine Release Assay

Für die Kultivierung der Zellen im Rahmen des *Cytokine Release Assays* werden polystyrene 96-Well-Rundbodenplatten verwendet.

2.2.4.1 Vollblut-Methode

Für die Vollblut-Methode werden 225 µl unverdünntes Vollblut mit 25 µl der jeweiligen Testsubstanz (in PBS) für 24 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. Pro Substanzkonzentration werden mindestens Duplikate angesetzt, optimal sind Triplikate. Leere Wells werden mit je 200 µl sterilem PBS gefüllt, um einer möglichen Verdunstung entgegenzuwirken. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellkulturplatten für 10 Minuten bei 1800 × g und 20 °C zentrifugiert. Die Plasmaüberstände werden abgenommen und auf 96-Well-Spitzbodenplatten überführt. Es erfolgt eine weitere Zentrifugation (10 Min., 1800 × g, 20 °C) und ein erneutes Überführen auf neue 96-Well-Spitzbodenplatten, um mögliche Zellreste in den Proben auszuschließen. Bei Bedarf werden die aliquotierten Überstände nochmals gesplittet. Die Platten werden mit Parafilm abgedichtet und im Anschluss bei -80 °C gelagert. Die Zytokinanalysen erfolgen innerhalb einer Woche nach Kryokonservierung der Überstände. Hierzu werden die Platten auf Eis aufgetaut, zentrifugiert (3 Min., 2000 × g, 20 °C) und die Proben mittels der *Meso Scale Discovery* (MSD) Plattform (*V-PLEX Proinflammatory Panel 1, human*) als Einzelwertbestimmungen je Probe analysiert (Kap. 2.2.7).

2.2.4.2 PBMC-Methode

Für die PBMC-Methode werden die Wells der 96-Well-Platten über Nacht mit je 50 µl Testsubstanz (in PBS) bei RT inkubiert. Nach der Inkubation werden die Testsubstanzen mit einer Multikanalpipette abgenommen und die Wells zweimal mit je 200 µl sterilem PBS gewaschen. Zum Absaugen kann hier eine Vakuumpumpe verwendet werden. PBMCs werden direkt nach ihrer Isolation aus humanem Vollblut oder nach Revitalisierung in einer Zellzahl von 8×10^5 Zellen/ml in einem Volumen von 250 µl Kultivierungsmedium pro Well ausgesät. Es folgt eine Inkubation für 24 Stunden unter Standardbedingungen. Pro Substanzkonzentration werden mindestens Duplikate angesetzt, optimal sind Triplikate. Leere Wells werden mit je 100 µl sterilem PBS gefüllt, um einer möglichen Verdunstung entgegenzuwirken. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellkulturplatten für 10 Minuten bei 360 × g und 20 °C zentrifugiert. Die Zellkulturüberstände werden abgenommen und auf 96-Well-Spitzbodenplatten überführt. Es erfolgt eine weitere Zentrifugation (10 Min., 360 × g, 20 °C) und ein erneutes Überführen auf neue 96-Well-Spitzbodenplatten, um mögliche Zellreste in den Proben auszuschließen. Bei Bedarf werden die aliquotierten Überstände nochmals gesplittet. Die Platten werden mit

Parafilm abgedichtet und im Anschluss bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Zytokinanalysen erfolgen innerhalb einer Woche nach Kryokonservierung der Überstände. Hierzu werden die Platten auf Eis aufgetaut, zentrifugiert (3 Min., $2000 \times g$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) und die Proben mittels der *Meso Scale Discovery* (MSD) Plattform (*V-PLEX Proinflammatory Panel 1, human*) als Einzelwertbestimmungen je Probe analysiert (Kap. 2.2.7).

2.2.5 Monozyten-Aktivierungstest

Mit Hilfe des Monozyten-Aktivierungstests (MAT; *PyroDetect System*, Merck) wird die Pyrogenaktivität einer Lösung *in vitro* über die Freisetzung von Interleukinen durch Monozyten in humanem Blut gemessen. Die Reaktion der Zellen auf pyrogenhaltige Substanzen wird durch die Bestimmung der Interleukin-1 β (IL-1 β)-Produktion mittels enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest (*enzyme-linked immunosorbent assay*; ELISA) gemessen. Hierbei ist die 96-Well-ELISA-Platte mit einem IL-1 β -spezifischen Antikörper beschichtet. Nach Zugabe des Humanblutes und der zu analysierenden Substanz bindet dieser Antikörper das von Monozyten produzierte IL-1 β . Durch einen Waschschrift werden unspezifisch gebundene Substanzen entfernt. Ein sekundärer, gegen IL-1 β gerichteter polyklonaler Antikörper wird hinzugegeben, welcher mit der Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*; HRP) konjugiert ist. Der Nachweis des gebundenen IL-1 β -Komplexes erfolgt durch Zugabe einer Chromogen / Substrat-Lösung aus Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Das gebundene Enzym ist in der Lage, TMB durch Spaltung zu aktivieren und in einen blauen Farbstoff umzuwandeln. Der Zusatz von Schwefelsäure (1 mol/l) stoppt diese Nachweisreaktion und bewirkt einen Farbumschlag nach Gelb. Die Enzymaktivität kann so photometrisch erfasst werden und ist proportional zur Menge gebundenem IL-1 β . Die Quantifizierung der IL-1 β -Produktion erfolgt anhand einer Kalibrierungskurve nach photometrischer Messung der Absorption am *Absorbance Microplate Reader ELx808™* bei 450 nm Test- und 630 nm Referenzwellenlänge. Der MAT setzt sich somit aus zwei Schritten zusammen: der Stimulation der IL-1 β -Produktion durch Inkubation des Blutes mit der zu testenden Substanz und einem IL-1 β ELISA. Die Durchführung des MAT erfolgt nach Protokoll des Herstellers.

2.2.6 BCA-Assay zur Proteinbestimmung

Der Bicinchoninsäure (BCA)-Assay ist eine kolorimetrische Methode zur quantitativen Proteinbestimmung und basiert auf der Biuret-Reaktion (Smith *et al.*, 1985). Hierbei wird zweiwertiger Kupfer (Cu^{2+}) unter alkalischen Bedingungen durch Proteine zu Cu^+ reduziert. Diese einwertigen Kupferionen bilden mit je zwei BCA-Molekülen einen Farbkomplex, welcher kolorimetrisch nachgewiesen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit dient diese Methode dazu, die Proteinkonzentration des *Imject™ Mariculture* KLHs (Pierce Biotechnology) nach Dialyse zu bestimmen. Es wird sowohl das nicht-dialysierte als auch das dialysierte KLH quantifiziert. Für diese Quantifizierung werden Triplikate drei verschiedener Verdünnungen angesetzt (1:10, 1:20, 1:50). Die Durchführung erfolgt mit Hilfe des *Pierce BCA Protein Assay Kits* (Thermo Scientific) nach Protokoll des Herstellers. Die Proteinmenge wird anhand einer Kalibrierungskurve nach photometrischer Messung der Absorption bei 562 nm am *SpectraMax® Plus 384 Microplate Reader* quantifiziert und mittels der *SoftMax* Software ausgewertet.

2.2.7 Nachweis von Zytokinen mittels Elektrochemilumineszenz (MSD)

Das Messprinzip der *Meso Scale Discovery* (MSD) Sandwich-Immunoassays basiert auf Elektrochemilumineszenz und ermöglicht die Quantifizierung verschiedener Zielproteinen (z.B. Zytokinen) in einer einzelnen Probe bei kleinem Probenvolumen. Die spezifischen Antikörper gegen das zu quantifizierende Zielprotein befinden sich hierbei auf einem Spot am Boden einer 96-Well-Platte, wobei ein Well bis zu 10 Spots mit verschiedenen Antikörpern enthalten kann. Bei Inkubation mit dem Probenmaterial binden die Proteine an die am Boden haftenden Antikörper und werden somit immobilisiert. Dem Sandwich-Prinzip entsprechend werden diese gebundenen Zielproteine wiederum von Detektionsantikörpern gebunden. An der Fc-Domäne des Detektionsantikörpers befindet sich eine elektrochemolumineszente Markierung, ein Rutheniumkomplex mit vier Sulfonatresten (Ruthenium(III)-tris-bipyridin-(4-methylsulfonat)-N-hydroxysuccinimidester; SULFO-TAG™). Zur finalen Detektion wird Spannung an die Elektroden der Platte angelegt. Das im Detektionspuffer enthaltene Tripropylamin (TPA) dient als Katalysator für eine zweifache Redoxreaktion mit dem Rutheniumkomplex. Diese Reaktion führt letztendlich zu einer Lichtemission durch die SULFO-TAG-Markierung, welche bei 620 nm gemessen wird. Das emittierte Licht kann schließlich quantifiziert und dem entsprechenden Spot bzw. Zielprotein zugewiesen werden. Die Lichtintensität korreliert mit dem Gehalt des entsprechenden Proteins in der Probe und kann durch entsprechende Standards in pg/ml bestimmt werden.

Der Nachweis von Zytokinen erfolgt an unverdünnten Zellkultur- sowie Plasmaüberständen mit Hilfe des *V-PLEX Proinflammatory Panel 1 (human)*. Bei dieser Multiplex-Analyse werden die Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 und IL-13 in einem Probenvolumen von jeweils 25 μ l quantitativ nachgewiesen. Zusätzlich zu den Überständen werden im Kit enthaltene Standards verwendet. Diese beinhalten die zu untersuchenden Analyte in definierten Konzentrationen und dienen der Erstellung einer Standardkurve. Die Durchführung erfolgt nach Protokoll des Herstellers. Nach der Messung am *MSD Sector Imager*

erfolgt die Auswertung der Messergebnisse mit der *MSD Discovery Workbench® Analysis* Software.

2.2.8 Generierung und Analyse von Aggregaten

2.2.8.1 Thermaler Stress

Zur artifiziiellen Generierung von Aggregaten werden die therapeutischen mAk MabThera (Rituximab), Arzerra (Ofatumumab), Remicade (Infliximab) und Humira (Adalimumab) thermalem Stress unterzogen (Abb. 12). Die Substanzen werden unter sterilen Bedingungen in 20 ml Headspace-Vials aliquotiert, welche mit Aluminium-Bördelkappen verschlossen werden. Sowohl Headspace-Vials als auch Bördelkappen werden zuvor autoklaviert. Es folgt eine Inkubation der Substanzen für 24 Stunden bei 55 °C im Wärmeschrank. Nach der Inkubation werden die behandelten Substanzen in Kryoröhrchen (Nalgene™) aliquotiert und bis zu ihrem Gebrauch, analog zu den nativen Antikörpern, bei - 80 °C gelagert.

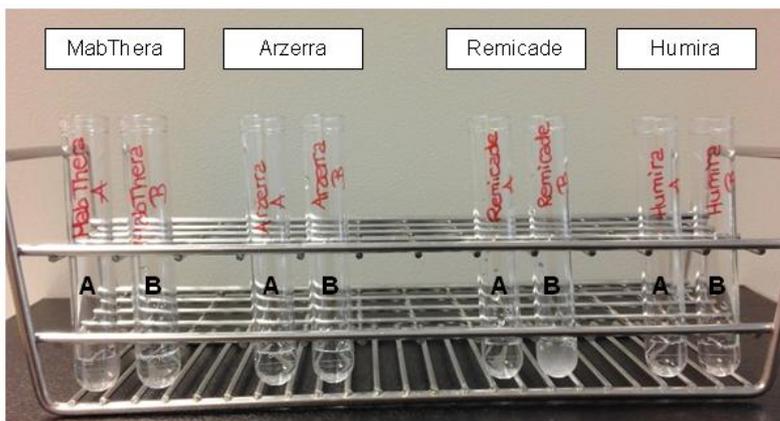


Abbildung 12: Native und aggregierte therapeutische monoklonale Antikörper. MabThera, Arzerra, Remicade und Humira, je nativ (A) und nach Aggregation durch thermalen Stress (B).

2.2.8.2 Dynamische Lichtstreuung

Die Charakterisierung des aggregierten Materials erfolgt mit der Methode der dynamischen Lichtstreuung (*dynamic light scattering*; DLS). Die DLS ist eine etablierte, nichtinvasive, Label-freie Technik mit der hydrodynamische Radien, Verteilungsbreiten (Polydispersitäten) und Aggregationseffekte von Proteinen und anderen Biomolekülen in kleinen Volumina bestimmt werden können. Hierzu wird das Streulicht eines Lasers an einer gelösten bzw. suspendierten Probe analysiert. Aufgrund der Brownschen Molekularbewegung kommt es zu zeitlichen Änderungen bzw. Fluktuationen der Streulichtintensität. Die Analyse dieser Intensitätsveränderung ergibt die Geschwindigkeit der Brownschen Molekularbewegung, woraus sich die Partikelgröße errechnen lässt. Sowohl die Temperatur als auch die Viskosität des Lösungsmittels und die Molekülgröße (Diffusionskoeffizient) bestimmen die Bewegung der

Partikel. Sind Temperatur und Lösungsmittel bekannt und konstant, ist die Veränderung der Lichtstreuintensität unmittelbar vom Diffusionskoeffizienten und damit von der Molekülgröße abhängig. Daraus lässt sich der hydrodynamische Radius ableiten. Für die Bestimmung der Polydispersität einer Probe wird ein Grenzwert von 15 % definiert. Proben mit einer Polydispersität < 15 % werden als monodispers angesehen. Ist der Polydispersitätsindex höher, sind Aggregationen vorhanden.

Die Analyse der aggregierten Proben wurde von Herrn André Hilpmann unter Leitung von Herrn Dr. Andreas Becker (BAG-PH-DD-CGEI-LDB-PT) im Labor Protein Technologies bei der Bayer AG in Berlin durchgeführt. Die Proben (5 mg/ml) wurden als Duplikate auf einer 384-Well-Platte am *DynaPro® Plate Reader™* der Firma Wyatt gemessen, die Auswertung erfolgte mit Hilfe der *DYNAMICS® 7.1.9* Software (Wyatt).

2.2.9 Statistische Analysen und Darstellungen

Die im Rahmen des *Cytokine Release Assays* aufgeführten hierarchischen Cluster- und Hauptkomponentenanalysen (*Principal Component Analysis*; PCA) wurden mit der Software *Genedata Profiler 10.0* durchgeführt. Alle weiteren statistischen Analysen und Graphiken wurden mittels *GraphPad Prism 6* erstellt.

Fold Change: Für die Bestimmung des Induktionsausmaßes wird das Verhältnis der Proben zur Kontrolle berechnet, indem pro Behandlungsgruppe der Quotient zur Kontrollgruppe gebildet wird. Quotient >1: Induktion; Quotient <1: Repression.

Varianzanalyse, n-faktoriell (*Analysis of Variance*; ANOVA, n-way): Die n-faktorielle ANOVA ist ein statistisches Verfahren, welches Unterschiede zwischen Mittelwerten verschiedener Gruppen ($n > 2$), bezogen auf mehrere Parameter, simultan auf Signifikanzen testet. Hierbei wird geprüft, ob zwischen den Gruppen eine größere Varianz vorliegt als innerhalb der einzelnen Gruppen. Je kleiner der resultierende p-Wert (Signifikanzwert) ist, desto höher ist die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen, bezogen auf den jeweiligen Parameter. Bei der ein-faktoriellen Varianzanalyse wird der Einfluss eines unabhängigen Faktors auf eine abhängige Variable betrachtet, während bei der zwei-faktoriellen Varianzanalyse die Effekte zweier unabhängiger Faktoren auf eine abhängige Variable untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit werden die statistische Signifikanz vorwiegend mittels zwei-faktorieller ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur ermittelt.

Schwellenwert-Analyse: Die Schwellenwert-Analyse im Rahmen der Experimente zum *Cytokine Release Assay* dient der Bestimmung der Frequenz positiver Reaktionen. Die induzierten mittleren Zytokinkonzentrationen jedes Donors pro Antikörperkonzentration (arithmetische Mittelwerte der Mehrfachbestimmung auf der Zellkulturplatte) werden mit denen

der korrespondierenden Konzentration eines klinisch unauffälligen mAKs (Erbix) verglichen. Hierzu wird ein Schwellenwert, basierend auf dem 95. Perzentil der Reaktionen aller Donoren auf Erbitux, festgelegt. Zytokinsekretionen über dem 95. Perzentil der Sekretionen bei korrespondierender Erbitux-Konzentration werden als positiv erachtet. Es wird der prozentuale Anteil positiver Reaktionen unter der Gesamtanzahl aller Donoren berechnet. Die Frequenz positiver Reaktionen kann graphisch gegen die jeweilige mediane Zytokinkonzentration aller Donoren aufgetragen werden.

Hierarchische Clusteranalyse (*hierarchical clustering*; HCA): Die HCA ist ein distanzbasiertes, statistisches Verfahren und wird klassischer Weise für die Analyse von Genexpressionsdaten angewendet, um Ähnlichkeiten zwischen Expressionsprofilen zu finden (Gollub und Sherlock, 2006). Auch in der Analyse immunologischer Daten findet die HCA immer häufiger Verwendung (Genser *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2010). So ermöglicht diese Analyse beispielsweise einen multidimensionalen Vergleich der bei Multiplex-Analysen gewonnenen Daten aller Zytokine verschiedener Donoren nach unterschiedlichen Stimuli.

Im Rahmen dieser Arbeit werden die induzierten medianen Konzentrationen der einzelnen Zytokine aller Donoren mittels HCA analysiert und unter den verschiedenen Behandlungsgruppen verglichen. Die Resultate werden mittels *Heatmap* und Dendrogramm, basierend auf ihrer Ähnlichkeit, visualisiert. Die relativen Mengen werden graphisch in einer *Heatmap* dargestellt. Hier repräsentieren die Spalten die analysierten Zytokine, während die Zeilen die einzelnen Behandlungsgruppen darstellen. Im Rahmen der verwendeten zweidimensionalen Clusterung sind sowohl die Spalten als auch die Zeilen anhand ihrer Ähnlichkeit geclustert. Somit liefert die zweidimensionale Clusteranalyse nicht nur Informationen über die Ähnlichkeit der induzierten Zytokinprofile nach unterschiedlichen *in vitro* Behandlungen (waagrecht), sondern auch über die Ähnlichkeit einzelner Zytokine zueinander innerhalb einer Behandlungsgruppe (senkrecht). Je näher Zeilen bzw. Spalten zueinander angeordnet sind, umso ähnlicher sind sich diese. Zur Visualisierung der Resultate der hierarchischen Clusteranalyse wird zusätzlich das Dendrogramm genutzt, das die multidimensionalen Beziehungen als zweidimensionale Liniengraphik darstellt. Die Clusterung basiert auf einer Entfernungsmatrix für zwei sich am meisten ähnelnde Zytokinprofile, denen alle weiteren Profile zugeordnet werden. Die einzelnen Daten werden schrittweise, entsprechend dem jeweils geringsten Abstand, zu immer größeren Clustern vereinigt, bis hin zur Fusion aller Daten. Ähnliche Profile, d.h. ähnliche relative Konzentrationen in den einzelnen analysierten Zytokinen, befinden sich daher im selben Cluster bzw. nahe beieinander. Die Ähnlichkeit zwischen Clustern wurde mit dem Distanzmaß der maximalen Entfernung (*maximum distance*) berechnet.

Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*; PCA): Eine PCA stellt eine statistische Technik dar, welche multidimensionale Expressionsdaten in einem mehrdimensionalen Raum darstellt. Diese Analyse ermöglicht eine vereinfachte Visualisierung

großer Datensätze, indem sie sowohl die Identifizierung von Ausreißern, aber auch von Konzentrations- oder zeitabhängigen Tendenzen ermöglicht (Raychaudhuri *et al.*, 2000). Die Dimensionalität der Daten wird von n- auf dreidimensional reduziert, sodass die Unterschiede bzw. Ähnlichkeiten zwischen Datensätzen deutlich werden: je näher die Daten beieinander liegen (*clustering*), umso ähnlicher sind sich diese.

In der vorliegenden Arbeit wird diese Technik angewandt, um vereinfacht darzustellen, wie die Gesamtheit des induzierten Zytokinprofils durch verschiedene Stimuli beeinflusst wird.

3 Ergebnisse

3.1 *In vitro* Kokultur humaner dendritischer Zellen mit T-Lymphozyten

Ein entscheidender Schritt bei der Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort ist die spezifische Aktivierung von DCs, welche die Grundlage für die Initiation einer T-Zell-vermittelten, adaptiven Immunreaktion darstellt.

Hierzu wurden zunächst Monozyten aus humanem Vollblut zu moDCs differenziert und auf Basis ihrer Oberflächenmarker und ihrer Fähigkeit zur Endozytose charakterisiert. Die Reifung der moDCs erfolgte durch Kultivierung mit unterschiedlich potenten Antigenen. Der Einfluss dieser Antigene auf die Expression der Oberflächenmarker wurde untersucht. Nach Reifung der moDCs erfolgte der Kontakt mit autologen T-Lymphozyten unter erneuter Antigenzugabe im Rahmen einer *in vitro* Kokultur. Nach sechstägiger Kokultivierung wurde der Aktivierungsstatus der Lymphozyten anhand ihrer Proliferation und der Expression eines Aktivierungsmarkers untersucht. Die T-Zell-Aktivierung spiegelt somit die Induktion einer primären Immunreaktion auf das Antigen wider. In einer erweiterten Kokultur über 16 Tage wurden diese T-Lymphozyten weitere zwei Male mit frisch generierten und spezifisch gereiften moDCs desselben Donors restimuliert. Diese Restimulation stellt den Zweitkontakt der T-Zellen mit dem Antigen dar (*Challenge*) und soll folglich die Sekundärantwort auf das Immunogen abbilden.

3.1.1 Generierung und Charakterisierung humaner dendritischer Zellen

Zur Generierung von DCs dienten Monozyten als Ausgangszellpopulation. Diese wurden anhand ihres spezifischen Oberflächenmarkers CD14 mit Hilfe der magnetischen Zellseparation aus humanen PBMCs isoliert. Sowohl die CD14-negative als auch die CD14-positive Fraktion wurde durchflusszytometrisch auf ihren Anteil an CD14⁺ Monozyten analysiert (Abb. 13). Die durch die Separation gewonnenen CD14⁺ Monozyten wiesen eine Reinheit von durchschnittlich 95 % auf, während die negative Fraktion nur noch 2,38 % Monozyten enthielt.

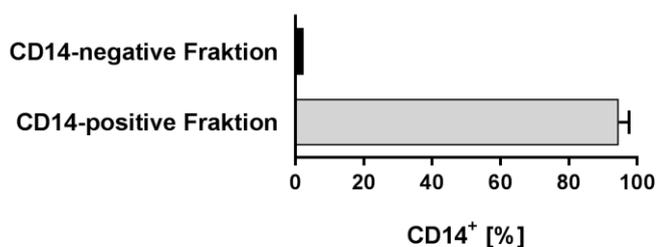


Abbildung 13: Reinheitsanalyse der aus PBMCs aufgereinigten CD14⁺ Monozyten. Die Aufreinigung der CD14⁺ Monozyten aus PBMCs erfolgte durch magnetische Zellseparation mit CD14 *MicroBeads*. Sowohl die gewonnenen Monozyten (CD14-positive Fraktion) als auch die CD14-negative Fraktion wurde durchflusszytometrisch auf ihren Anteil an CD14⁺ Monozyten analysiert. Die Daten zeigen den arithmetischen Mittelwert \pm SD (n=6).

Zur anschließenden Differenzierung von DCs aus CD14⁺ Monozyten wurden diese unter Zugabe der Zytokine GM-CSF [55 ng/ml] und IL-4 [30 ng/ml] über einen Zeitraum von acht Tagen kultiviert. Während dieser Zeit wurde die Expression ausgewählter Oberflächenmarker (CD14, CD11c, CD209, HLA-DR, CD40, CD80, CD83 und CD86) täglich durchflusszytometrisch analysiert. Die Analyse der Expression erfolgte sowohl bei Zellen, die mit als auch vergleichend ohne Differenzierungsstimulus kultiviert wurden. Ein Differenzierungsstimulus von 100 ng/ml GM-CSF und 40 ng/ml IL-4 wurde ebenfalls untersucht und resultierte in einem ähnlichen Oberflächenmarkerprofil der moDCs (Daten nicht gezeigt).

Bei Betrachtung der durchflusszytometrischen Analysen wird zunächst deutlich, dass die Zellen aller vier Donoren eine vergleichbare Entwicklung der Oberflächenmarker im zeitlichen Verlauf aufwiesen (Abb. 14). Der Anteil an CD14⁺ / CD11c⁺ Zellen unter Monozyten, die mit GM-CSF und IL-4 kultiviert wurden, nahm von etwa 100 % an Tag 0 und etwa 90 % an Tag 3 bis auf durchschnittlich 0,4 % an Tag 6 der Kultur ab. Bei Monozyten, die ohne diesen Differenzierungsstimulus kultiviert wurden, blieb der Anteil CD14⁺ / CD11c⁺ Zellen hingegen über die Zeit konstant bei 95 – 100 % (Abb. 14A).

Invers hierzu verhielt sich die Entwicklung der Expression des Oberflächenmarkers CD11c (CD14⁻ / CD11c⁺) über die Zeit. Während der Anteil einfach CD11c-positiver Zellen im Verlauf der Differenzierung auf bis zu 96 % anstieg, lag dieser bei undifferenzierten Monozyten während der gesamten Kultivierungsdauer bei < 20 % (Abb. 14B).

Auch der Anteil CD209-exprimierender Zellen stieg mit zunehmender Differenzierung von 24 – 52 % auf bis zu 100 % an, wohingegen undifferenzierte Monozyten weniger als 5 % CD209-positiv Zellen aufwiesen (Abb. 14C).

Die HLA-DR-Expression undifferenzierter Monozyten unterschied sich nicht von der Expression sich differenzierender Zellen. Zu Beginn der Kultur (Tag 0) wurde HLA-DR von durchschnittlich 52 % der Zellen exprimiert und lag ab Tag 3 bei etwa 96 % (Abb. 14D).

Der prozentuale Anteil CD40-exprimierender Zellen stieg bei sich differenzierenden Zellen bis Tag 2 zunächst von 0 % auf ein Maximum von 91 – 97 % an, gefolgt von einer starken Abnahme in den folgenden zwei Tagen auf bis zu 13 – 17 %. An Tag 8 wiesen nur noch 6 – 12 % der mit Differenzierungsstimulus kultivierten Zellen diesen Oberflächenmarker auf. Unter den undifferenzierten Monozyten waren 98 – 100 % während der gesamten Kultivierungsdauer CD40-negativ (Abb. 14E).

Der Oberflächenmarker CD80 wurde über die gesamte Kultivierungsdauer hinweg bis Tag 7 von < 9 % der sich differenzierenden Zellen exprimiert. An Tag 8 stieg diese Expression auf bis zu 22 % an, während undifferenzierte Monozyten über die gesamte Zeit hinweg (einschließlich Tag 8) CD80-negativ waren (Abb. 14F).

Sowohl undifferenzierte als auch sich differenzierende Zellen wiesen zu Beginn der Kultur bis einschließlich Tag 3 weniger als 1 % CD83-exprimierende Zellen auf. Ab Tag 4 erhöhte sich der Anteil auf 6 – 19 %, wobei der Anstieg unabhängig vom Differenzierungsstimulus war (Abb. 14G).

CD86 zeigte als einziger Marker eine unregelmäßige Entwicklung der prozentualen Anteile positiver Zellen mit starken Schwankungen im zeitlichen Verlauf. Sich differenzierende Zellen enthielten an Tag 1 bis 2 einen maximalen Anteil CD86-positiver Zellen von 34 – 50 %. Dieser Anteil nahm bis Tag 7 auf 5 – 7,5 % ab. An Tag 8 stieg der Anteil auf 14 – 37 % an. Der Anteil CD86-positiver Zellen lag bei undifferenzierten Monozyten bis Tag 5 bei ≤ 16 %. Je nach Donor stieg dieser Anteil bereits an Tag 6 oder erst an Tag 8 auf bis zu 20 – 55 % an (Abb. 14H).

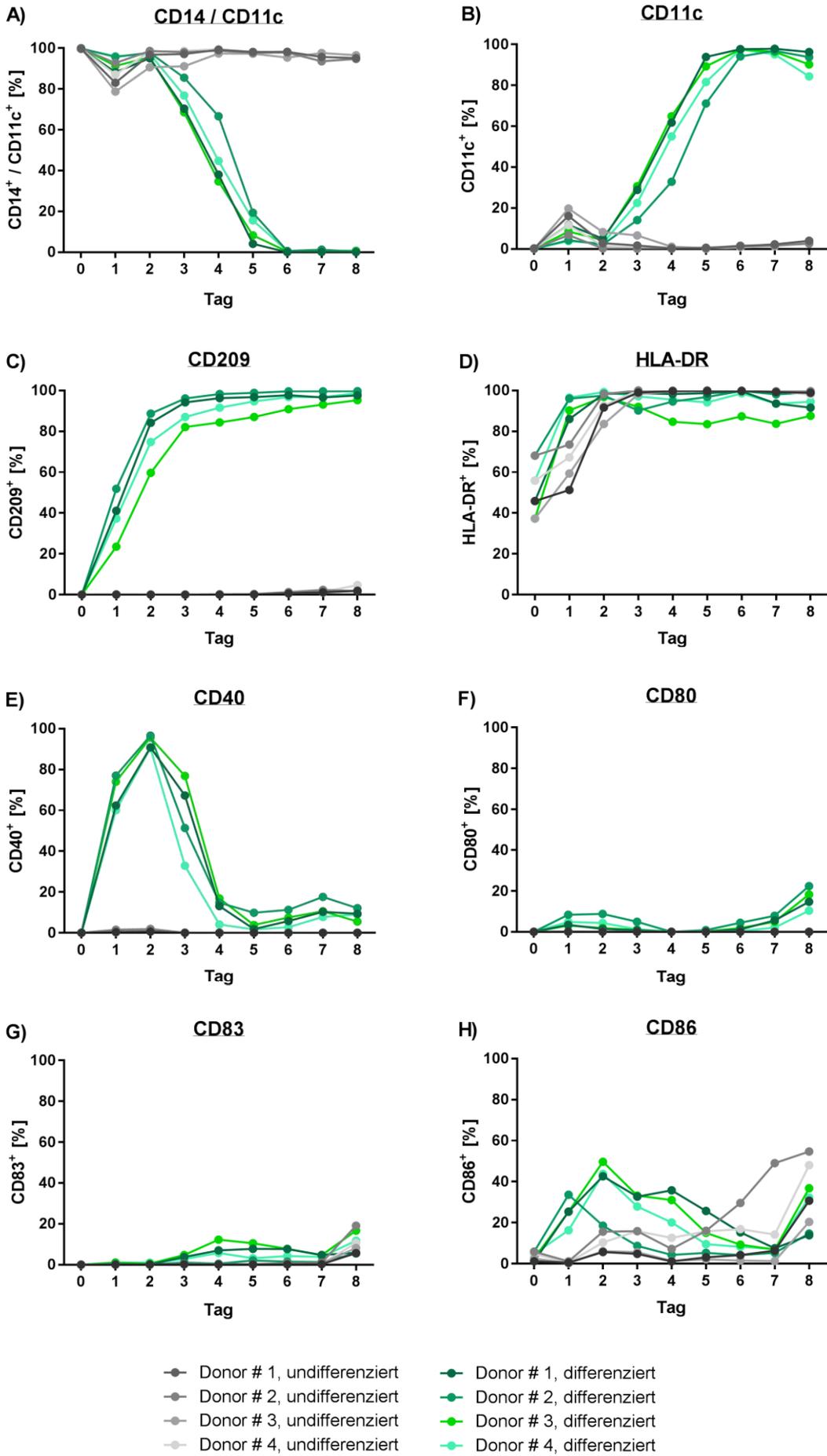


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse der Entwicklung der Oberflächenmarker während der Differenzierung von Monozyten zu moDCs. A) CD14 / CD11c, B) CD11c, C) CD209, D) HLA-DR, E) CD40, F) CD80, G) CD83, H) CD86. Zur Generierung von moDCs wurden Monozyten von vier verschiedenen Donoren (n=4) über acht Tage unter Zugabe von IL-4 [30 µg/ml] und GM-CSF [55 µg/ml] kultiviert. Die durchflusszytometrische Charakterisierung anhand ihrer Oberflächenmarker erfolgte täglich. Undifferenzierte Monozyten derselben Donoren (Kultivierung ohne Zytokinstimulus) stellen die Negativkontrolle dar. Dargestellt ist der prozentuale Anteil positiver Zellen für den jeweiligen Oberflächenmarker, bezogen auf die Gesamtpopulation.

Wie bereits gezeigt (Abb. 14A, B), exprimieren sowohl Monozyten als auch ausdifferenzierte moDCs den Oberflächenmarker CD11c. Somit war für eine Überprüfung der Differenzierung eine kombinierte Analyse der Oberflächenantigene CD14 und CD11c nötig (Abb. 15). Es ergaben sich die charakteristischen Oberflächenmarkerprofile für den jeweiligen Zelltyp. Während es sich bei undifferenzierten Monozyten um CD14⁺/CD11c⁺ Zellen handelte (Abb. 15A, Q2), waren ausdifferenzierte moDCs bereits ab Tag 6 der Kultur CD14⁻/CD11c⁺ (Abb. 15B, Q4).

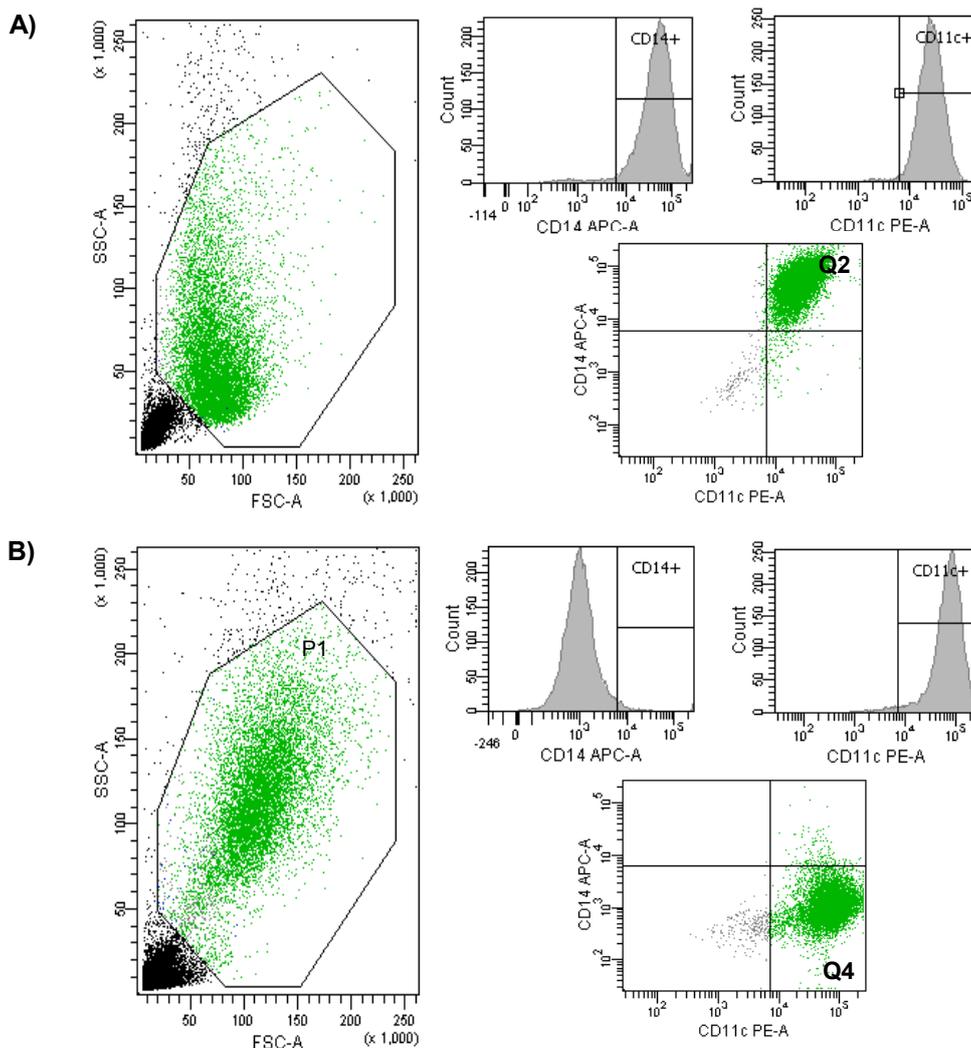


Abbildung 15: Exemplarische durchflusszytometrische Analyse zur Überprüfung der Differenzierung von Monozyten zu moDCs an Tag 6. Expression der Oberflächenmarker CD14 und CD11c an Tag 6 der Kultur, dargestellt sowohl im Histogramm als auch im *dot plot*. A) Monozyten ohne Zytokinstimulus während der Kultivierung. B) Ausdifferenzierte moDCs.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Differenzierung wurden durch eine morphologische Betrachtung der Zellen am Durchlichtmikroskop nach Pappenheim-Färbung unterstützt. Auch hier unterschieden sich die Zellen (Abb. 16): Monozyten (Abb. 16A, C) waren mit einem Durchmesser von etwa 15 – 20 µm deutlich kleiner als ausdifferenzierte moDCs (Abb. 16B, D). Zudem war ihr meist nierenförmiger Zellkern im Verhältnis zu ihrem geringen Zytoplasma sehr groß. Die generierten moDCs hingegen hatten bereits an Tag 6 der Differenzierung eine Größe von ungefähr 20 – 30 µm und wiesen eine kugelförmige Gestalt mit feinen zytoplasmatischen Fortsätzen auf.

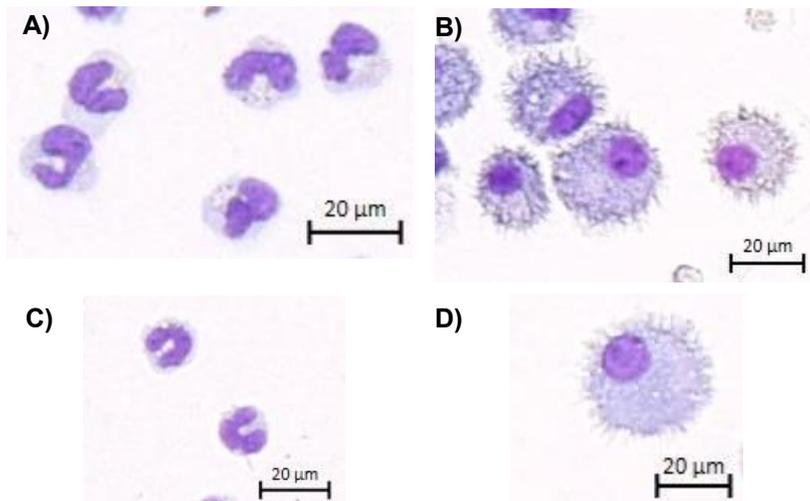


Abbildung 16: Morphologischer Vergleich von Monozyten und moDCs. Durchlicht-mikroskopische Aufnahmen von Monozyten an Tag 0 (A, C) und moDCs an Tag 6 (B, D) der Kultur nach Pappenheim-Färbung.

Eine Analyse der Differenzierung von Monozyten zu moDCs an 18 verschiedenen Donoren ergab, dass undifferenzierte Monozyten an Tag 8 der Kultur durchschnittlich zu 90,47 % aus doppelt positiven ($CD14^+ / CD11c^+$) Zellen bestanden, während durch eine Differenzierung durchschnittlich 86,78 % $CD14^- / CD11c^+$ Zellen generiert wurden (Abb. 17).

Eine erfolgreiche Differenzierung wurde für die folgenden Versuche als solche definiert, welche > 80 % moDCs, also $CD14^- / CD11c^+$ Zellen, generierte.

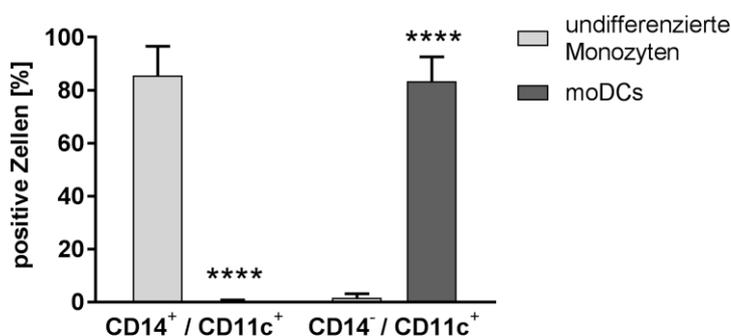


Abbildung 17: Analyse der Differenzierung von Monozyten zu moDCs anhand der Oberflächenmarker CD14 und CD11c an Tag 8. Die Analyse der Expression der Oberflächenmarker CD14 und CD11c von undifferenzierten Monozyten und differenzierten moDCs desselben Donors erfolgte durchflusszytometrisch. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert \pm SD, n=18. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur, bezogen auf die jeweilige Gruppe undifferenzierter Monozyten, ermittelt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Zusätzlich wurde die Reproduzierbarkeit der Generierung von moDCs aus Monozyten desselben Donors untersucht (Tab. 8). Die Ergebnisse der Differenzierungsanalyse drei unabhängiger Experimente (Donor 1A, 1B, 1C) wiesen bei undifferenzierten Monozyten desselben Donors einen Anteil von 83,7 – 89,5 % an CD14⁺ / CD11c⁺ Zellen und somit einen Variationskoeffizienten (*coefficient of variation*; CV) von 3,4 % auf. Der CV bei den ausdifferenzierten moDCs betrug 1,6 %.

Tabelle 8: Analyse der Reproduzierbarkeit der Generierung von moDCs aus Monozyten am Beispiel eines Donors. CD14⁺ Monozyten desselben Donors wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (im zeitlichen Abstand von je einer Woche) revitalisiert und nach Standardprotokoll zu moDCs differenziert. Als Kontrolle dienten undifferenzierte Monozyten (Kultivierung ohne Zytokinstimulus). Die Daten zeigen die CD14- und CD11c-Expression undifferenzierter Monozyten und differenzierter moDCs an Tag 8 innerhalb drei unabhängiger Experimente (Donor 1 A-C, n=3; Angaben in % der Gesamtpopulation; CV: Variationskoeffizient).

	Undifferenzierte Monozyten CD14 ⁺ / CD11c ⁺ [%]	moDCs CD14 ⁻ / CD11c ⁺ [%]
Donor 1 A	89,5	82,1
Donor 1 B	83,7	84,6
Donor 1 C	85,6	82,6
CV [%]	3,4	1,6

Der prozentuale Anteil gewonnener moDCs von Zellen desselben Donors war demnach in unabhängigen Experimenten reproduzierbar.

3.1.2 Messung der Endozytosefähigkeit dendritischer Zellen

DCs zeichnen sich als professionelle APCs durch ihre hohe endozytotische Aktivität aus, welche Voraussetzung für eine effektive Antigenaufnahme und die anschließende Antigenpräsentation und Antigenerkennung durch T-Zellen ist.

Um die Endozytosefähigkeit der generierten moDCs im Vergleich zu undifferenzierten Monozyten zu untersuchen, wurden die Zellen mit FITC-gekoppelte DX- und OVA-Molekülen inkubiert. Die Messung der Aufnahme und Akkumulation dieser FITC-markierten Moleküle in den jeweiligen Zellen erfolgte durchflusszytometrisch.

Zunächst wurde die Endozytosefähigkeit der Zellen in Abhängigkeit vom aufzunehmenden Molekül (DX oder OVA, je 0,5 µg/ml) untersucht (Abb. 18). Da, basierend auf den Ergebnissen zur Analyse der Differenzierung, für spätere Experimente eine Zugabe des jeweiligen Antigens an Tag 6 der Kultur geplant war, wurde zunächst die Aufnahme der FITC-markierten Moleküle durch ausdifferenzierte moDCs an Tag 6 der Kultur analysiert. Exemplarische Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse sind im Folgenden dargestellt (Abb. 18). Diese zeigten deutliche Unterschiede in der Aufnahme von OVA-FITC und DX-FITC durch moDCs. Die OVA-

FITC-Aufnahme (Abb. 18C) betrug 94,4 %, bei einer Hintergrundfluoreszenz von 11,5 % (Inkubation der Zellen mit FITC-Molekülen bei 4 °C; Abb. 18A). DX-FITC hingegen (Abb. 18D) akkumulierte zu 32,0 % in den moDCs, bei einer Hintergrundfluoreszenz von 5,1 % (Abb. 18B).

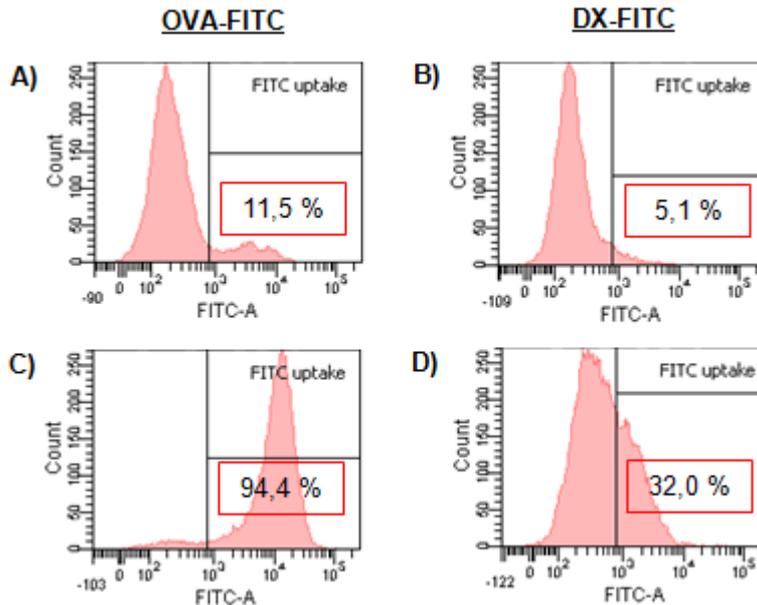


Abbildung 18: Exemplarische Histogramme einer durchflusszytometrischen Analyse der Akkumulation von DX-FITC und OVA-FITC in moDCs an Tag 6 der Kultur. Aufnahme von OVA-FITC (A, C) und DX-FITC (B, D) von moDCs an Tag 6 der Differenzierung. A, B Hintergrundfluoreszenz (Inkubation der Zellen mit den FITC-Molekülen [0,5 mg/ml], 30 Min., 4 °C). C, D Aufnahme nach Inkubation der Zellen für 30 Minuten bei 37 °C mit FITC-markierten Makromolekülen (DX, OVA [0,5 mg/ml]).

Im Rahmen der folgenden Versuche wurde die Endozytosefähigkeit der Zellen im zeitlichen Verlauf bis einschließlich Tag 6 untersucht (Abb. 19). Die Aufnahme durch undifferenzierte Monozyten wurde mit der Endozytosefähigkeit der sich zu moDCs differenzierenden Zellen verglichen.

Die Aufnahme von OVA-FITC-Molekülen (Abb. 19A) nahm im zeitlichen Verlauf von 60 % (Tag 0) auf etwa 80 % (Tag 6) zu. Der Vergleich von undifferenzierten Monozyten mit sich zu moDCs differenzierenden Zellen ließ keinen Unterschied in der prozentualen Akkumulation von OVA-FITC in den Zellen erkennen.

Im Gegensatz hierzu betrug die mittlere Akkumulation von DX-FITC (Abb. 19B) an Tag 0 der Kultur 12,09 % ($\pm 3,78$). Während die DX-FITC-Aufnahme durch Monozyten im zeitlichen Verlauf nahezu unverändert blieb (Tag 6: 10,10 % $\pm 7,76$), stieg diese mit zunehmender Differenzierung der Monozyten zu moDCs hingegen signifikant an. An Tag 5 der Kultur war sie im Mittel um ein 2,66-faches (32,11 % $\pm 20,57$), an Tag 6 um das 2,38-fache (28,74 % $\pm 9,46$) höher als an Tag 0.

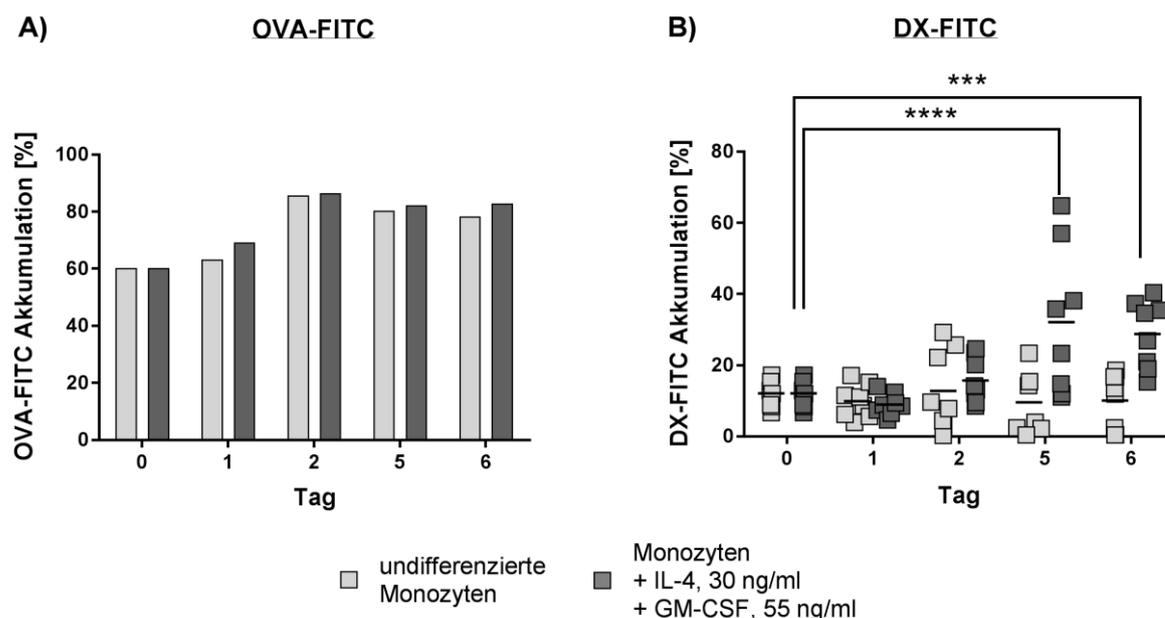


Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse der Endozytose von FITC-markierten Molekülen durch Monozyten und sich zu moDCs differenzierenden Zellen. Aufnahme von FITC-markierten Molekülen durch Monozyten und sich zu moDCs differenzierenden Zellen im zeitlichen Verlauf. A) OVA-FITC (n=1), B) DX-FITC (n=8). Die Zellen wurden für 30 Minuten bei 37 °C mit OVA-FITC bzw. DX-FITC [0,5 mg/ml] inkubiert. Die Analyse der Aufnahme der FITC-markierten Moleküle durch die unterschiedlichen Zellen erfolgte durchflusszytometrisch. Undifferenzierte Monozyten dienten als Negativkontrolle. Die Hintergrundfluoreszenz (Inkubation der Zellen mit OVA-FITC bzw. DX-FITC [0,5 mg/ml], 30 Min., 4 °C) wurde subtrahiert. Die Daten zeigen die prozentuale Akkumulation von OVA-FITC bzw. DX-FITC. Dargestellt sind die Einzelwerte der Donoren (A, B) mit arithmetischem Mittelwert pro Zeitpunkt (B; Querstrich, n=8). Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur ermittelt: *** p<0,001; **** p<0,0001.

In den darauf folgenden Experimenten wurde der Einfluss von TNF- α auf die Fähigkeit von moDCs zur Endozytose untersucht (Abb. 20). Hierbei erfolgte die Differenzierung von Monozyten zu moDCs sowohl nach Standardprotokoll als auch unter Zugabe von TNF- α für 48 und 96 Stunden. Die Analyse der DX-FITC-Aufnahme durch undifferenzierte Monozyten und ausdifferenzierte moDCs erfolgte an Tag 6 der Kultur. Wie bereits erwähnt, bewirkte die Differenzierung von Monozyten zu moDCs eine signifikante Erhöhung der DX-FITC-Aufnahme und -Akkumulation in moDCs. Eine Kultivierung der sich zu moDCs differenzierenden Zellen mit TNF- α für die letzten 48 Stunden der sechstägigen Kultur resultierte in einer nicht signifikanten Reduktion der mittleren DX-FITC-Aufnahme im Vergleich zu den nach Standardprotokoll (ohne TNF- α) generierten moDCs. Eine 96-stündige Kultivierung der Zellen mit TNF- α führte zu einer signifikanten Reduktion (Abb. 20A).

Dieser Einfluss von TNF- α auf die Akkumulation von DX-FITC in den jeweiligen Zellen ist anhand der Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse repräsentativ für die Ergebnisse aller Donoren dargestellt (Abb. 20B-E).

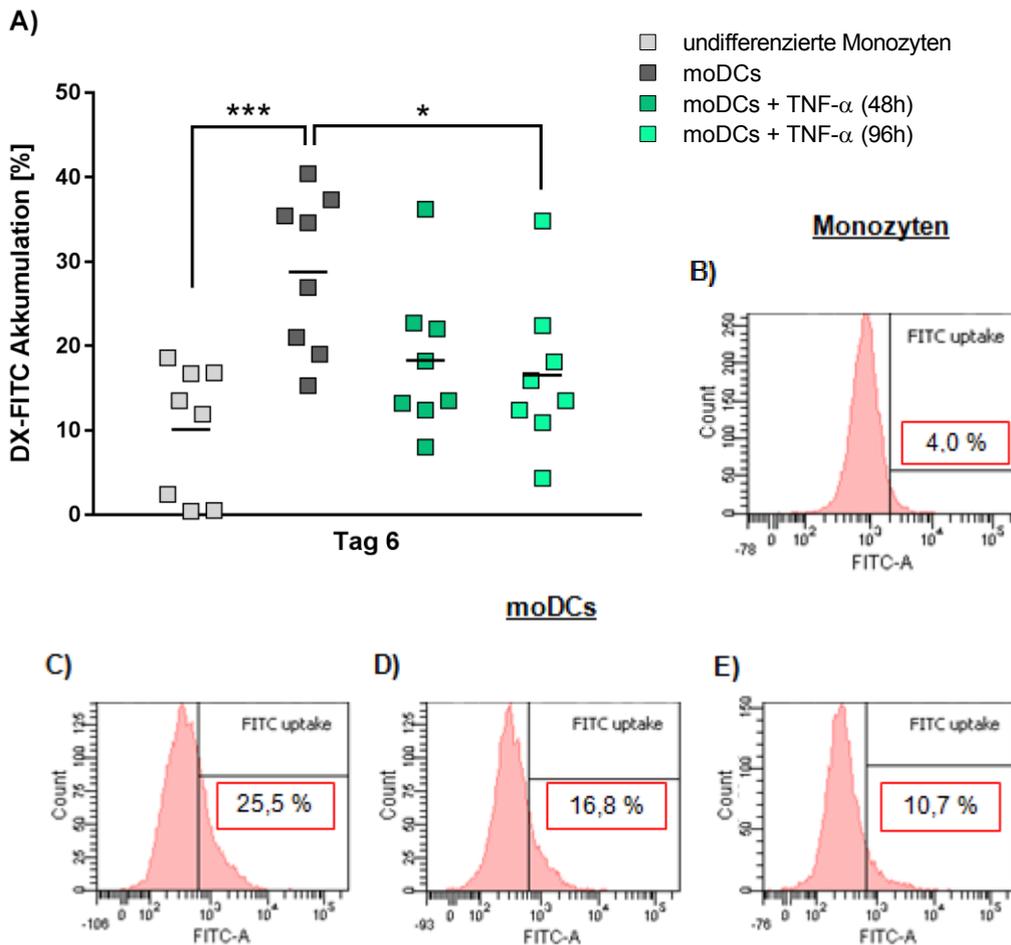


Abbildung 20: Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses von TNF- α auf die Endozytose von DX-FITC durch Monozyten und moDCs an Tag 6 der Kultur. A) Analyse der DX-FITC-Akkumulation in Monozyten und moDCs an Tag 6 der Kultur sowie des Einflusses von TNF- α auf die Endozytosefähigkeit von moDCs. Die Differenzierung der Monozyten zu moDCs erfolgte sowohl nach Standardprotokoll als auch unter Zugabe von TNF- α für 48 und 96 Stunden. An Tag 6 der Kultur wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37 °C mit DX-FITC [0,5 mg/ml] inkubiert. Die Analyse der DX-FITC-Aufnahme durch die Zellen erfolgte durchflusszytometrisch. Undifferenzierte Monozyten dienen als Negativkontrolle. Die Hintergrundfluoreszenz (Inkubation der Zellen mit DX-FITC [0,5 mg/ml], 30 Min., 4 °C) wurde subtrahiert. Die Daten zeigen die prozentuale Akkumulation von DX-FITC. Dargestellt sind die Einzelwerte der Donoren mit arithmetischem Mittelwert pro Behandlungsgruppe (Querstrich, n=8). Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur ermittelt: * p<0,05; ** p<0,01. B - E) Repräsentative Histogramme einer durchflusszytometrischen Analyse. DX-FITC-Akkumulation in Monozyten (B), moDCs (C), moDCs nach Inkubation mit TNF- α für 48 Stunden (D) und moDCs nach Inkubation mit TNF- α für 96 Stunden (E).

3.1.3 Etablierung von Positivkontrollen zur Zellaktivierung

Nach Etablierung des Protokolls zur Generierung von moDCs aus Monozyten wurde der Einfluss unterschiedlicher Reifungsstimuli auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker der moDCs untersucht. Darüber hinaus galt es zu ermitteln, welchen Einfluss die einzelnen Oberflächenmarkerprofile auf T-Zellen und deren Aktivierung haben. Ziel war es, Positivkontrollen für eine Aktivierung sowohl von moDCs als auch von T-Zellen und somit für die Induktion einer Primärantwort zu etablieren.

Einfluss verschiedener Reifungsstimuli auf die Expression der Oberflächenmarker dendritischer Zellen

Nach sechstägiger Differenzierung wurden moDCs für 48 Stunden mit TNF- α [20 ng/ml], LPS [0,2 μ g/ml] oder einem proinflammatorischen Cocktail gereift. Als Kontrolle dienten mit Zellkulturmedium behandelte moDCs, welche im Folgenden als „unreife moDCs“ bezeichnet werden. Am Tag 8 erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Expression der Oberflächenmarker CD80, CD83, CD86, CD209, CD40 und HLA-DR (Abb. 21A, B). Da alle moDCs *per se* eine maximale HLA-DR Expression von 98 – 100 % aufzeigten, erwies es sich hier als geeignet, die Population der HLA-DR^{high}-exprimierenden Zellen mit einzubeziehen (Abb. 21C, D).

Eine Reifung der moDCs mit TNF- α führte zu einem signifikanten Anstieg der CD83- und CD86-Expressionen im Vergleich zur Kontrolle. Bei CD83 betrug diese Induktion das durchschnittlich 7,62-fache und bei CD86 das 2,78-fache der Kontrolle. Einen geringeren Einfluss hatte TNF- α auf den Anteil CD80-positiver Zellen mit einem nicht signifikanten Anstieg um das 1,30-fache der Kontrolle. Sowohl der Anteil CD209- als auch CD40-positiver Zellen nahm nach Reifung der Zellen mit TNF- α ab. Beim Oberflächenmarker CD209 reduzierte sich der Anteil positiver Zellen um das 1,17-fache der Kontrolle, während die Zellen bei CD40 eine Abnahme um das 1,20-fache zeigten. Der Anteil HLA-DR^{high}-exprimierender Zellen stieg signifikant um das 1,70-fache an.

LPS führte als Reifungsstimulus bei allen analysierten Oberflächenmarkern zu einer signifikanten Veränderung ihrer Expression. Der Anteil CD80-positiver Zellen stieg durchschnittlich um ein 2,18-faches, der Anteil CD86-positiver Zellen um das 3,48-fache an. CD83 zeigte mit einer Induktion um das 12,88-fache den höchsten Anstieg im Anteil positiver Zellen. Der Anteil CD209-exprimierender Zellen nahm nach LPS-Stimulation um das 1,61-fache ab, der der CD40-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrolle um das 1,28-fache zu. Bei HLA-DR^{high} lag die Stärke der Induktion mit einer Erhöhung der Expression um das 1,68-fache im Bereich der Werte nach TNF- α -Stimulation. Bei allen übrigen Markern hatte LPS im Vergleich zu TNF- α einen stärkeren Einfluss auf ihre Expression.

Auch die Stimulation der moDCs mit einem proinflammatorischen Cocktail resultierte bei allen analysierten Oberflächenmarkern in einer signifikanten Veränderung ihrer Expression. Im Vergleich zu den oben genannten Reifungsstimuli beeinflusste dieser das Expressionsprofil aller Marker am stärksten. Der Anteil CD80-positiver Zellen stieg um durchschnittlich ein 2,36-faches der Kontrolle, der der CD86-positiven Zellen um das 3,50-fache. Somit unterschied sich Letzterer lediglich um das 0,02-fache von der Induktion durch LPS-Stimulation. CD83 zeigte auch hier, mit einer Induktion um das durchschnittlich 14,67-fache, den höchsten Anstieg im Anteil positiver Zellen. Die CD209-Expression nahm nach Stimulation mit dem

proinflammatorischen Cocktail um das 1,73-fache der Kontrolle ab, während die CD40-Expression im Mittel um das 1,66-fache induziert wurde. Der Anteil HLA-DR^{high}-exprimierender Zellen stieg innerhalb der Population um das 1,90-fache an.

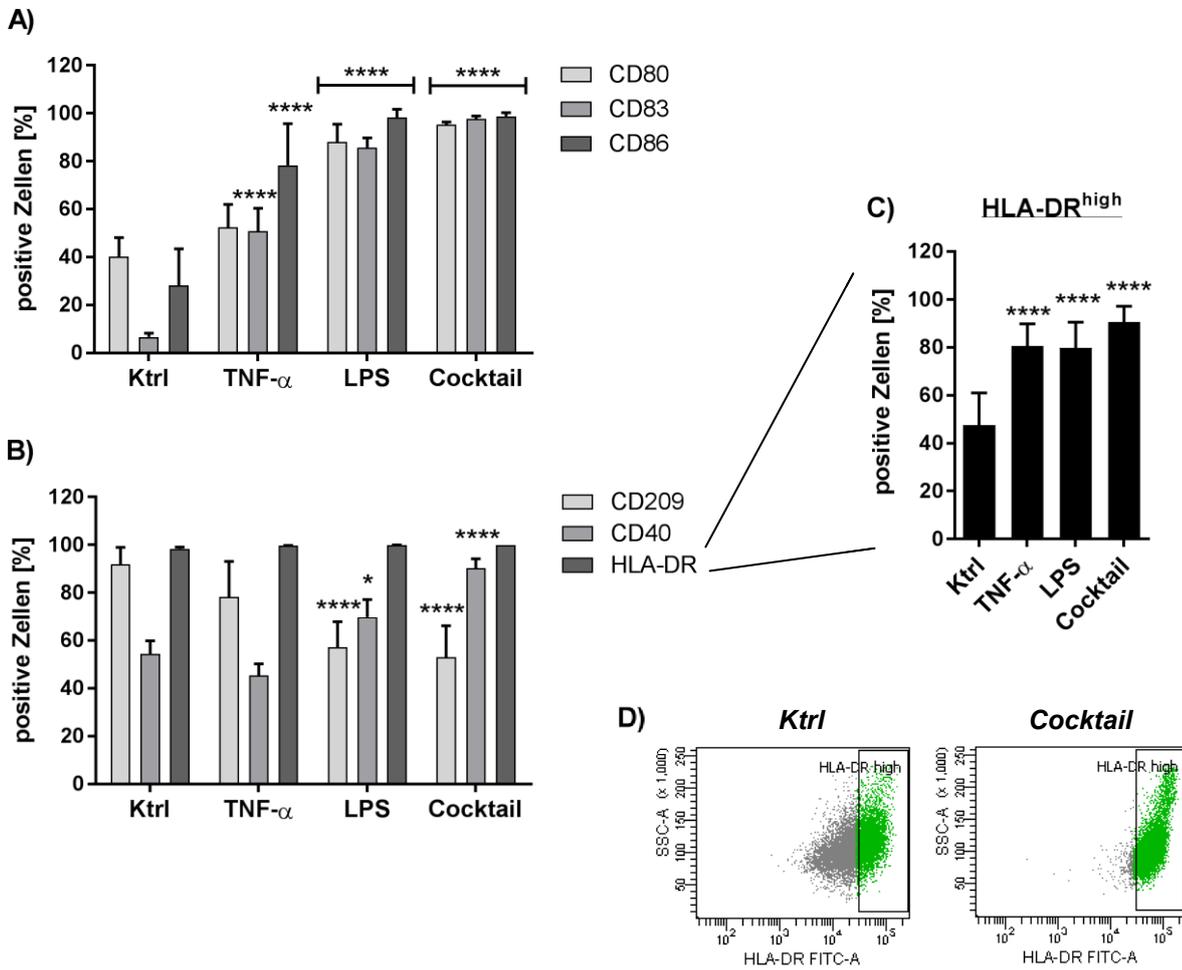


Abbildung 21: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf moDCs nach Stimulation mit unterschiedlichen Reifungsstimuli. DCs wurden für 48 Stunden mit TNF- α [20 ng/ml], LPS [0,2 μ g/ml] oder einem proinflammatorischen Cocktail behandelt und auf ihre Oberflächenmarker analysiert. A) CD80, CD83, CD86. B) CD209, CD40, HLA-DR. C) HLA-DR^{high}. D) Beispiel einer durchflusszytometrischen Analyse von HLA-DR^{high}. Als Kontrolle (Ktrl) dienen mit Zellkulturmedium behandelte moDCs. Die Daten (A-C) zeigen die mittlere prozentuale Expression der jeweiligen Oberflächenmarker pro Behandlungsgruppe \pm SD (Ktrl, Cocktail: n=7; TNF- α , LPS: n=6). Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur, bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe, ermittelt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001.

Zusammenfassend lässt sich herausstellen, dass TNF- α den geringsten Einfluss auf das Oberflächenmarkerprofil der moDCs hatte. LPS und insbesondere der proinflammatorische Cocktail beeinflussten die Expression aller Oberflächenmarker hingegen signifikant.

Unter allen analysierten Oberflächenmarkern war CD209 der einzige, dessen Expression durch Stimulation mit TNF- α , LPS oder dem Cocktail abnahm. Bei allen anderen Markern zeigte sich die veränderte Expression in Form einer Induktion. Hierbei stellte sich CD83 als sensitivster

Marker heraus (7,62 – 14,67-fache Induktion), wohingegen die CD40-Expression die schwächsten Effekte zeigte (0,84 – 1,66-fache Induktion).

Eine weitere Alternative zur Bestimmung des prozentualen Anteils HLA-DR^{high}-positiver Zellen stellt die Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität auf Basis der Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse dar (Abb. 22). Ähnlich wie bei der HLA-DR^{high}-exprimierenden Population wurde auch hier der signifikante Einfluss aller Reifungsstimuli auf diesen Oberflächenmarker im Vergleich zur Kontrolle deutlich.

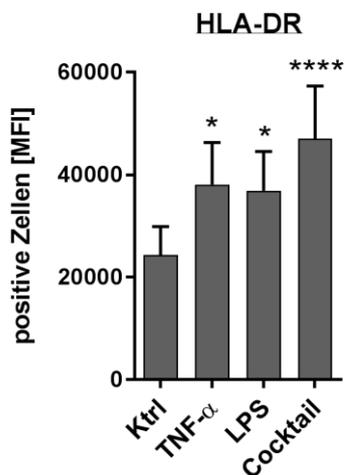


Abbildung 22: Alternative durchflusszytometrische Analyse der HLA-DR-Expression von moDCs nach Stimulation mit unterschiedlichen Reifungsstimuli. Die Daten zeigen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für HLA-DR pro Behandlungsgruppe \pm SD (Ktrl, Cocktail: n=7; TNF- α , LPS: n=6). Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur, bezogen auf die Kontrollgruppe, ermittelt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001.

Somit eignet sich für die Betrachtung des Oberflächenmarkers HLA-DR sowohl die Darstellung der HLA-DR^{high}-exprimierenden Population als auch die Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität auf Basis der Histogramme von HLA-DR, um einen möglichen Einfluss verschiedener Substanzen auf dessen Expression herauszustellen.

Einfluss verschiedener Reifungsstimuli auf die T_H-Zell-Aktivierung

Ein weiteres Ziel im Rahmen dieser Experimente war es zu ermitteln, welchen Einfluss eine Kokultivierung der spezifisch gereiften moDCs mit autologen CD4⁺ T_H-Zellen auf den Aktivierungsstatus dieser T_H-Zellen hat. Hierfür wurden die T_H-Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26 markiert und für sechs Tage mit spezifisch gereiften moDCs kokultiviert. Als Negativkontrolle dienten Kokulturen von T_H-Zellen mit unreifen moDCs, als Positivkontrolle ConA-behandelte Monokulturen von T_H-Zellen. Die Analyse der T-Zell-Aktivierung erfolgte anhand der induzierten T-Zell-Proliferation (PKH26-positive T_H-Zellen) und der Expression des Aktivierungsmarkers CD25.

Die durchflusszytometrischen Analysen der T-Zell-Aktivierung zeigen, dass bereits eine Kokultivierung von unreifen moDCs mit autologen T_H-Zellen zu einer minimalen Aktivierung der T_H-Zellen führte (Abb. 23). Die mittlere T-Zell-Proliferation lag bei 16,83 % (\pm 10,92) mit einem durchschnittlichen Anteil CD25-positiver T_H-Zellen von 20,71 % (\pm 9,57). Eine Kokultivierung mit

moDCs, welche zuvor mit den Reifungsstimuli TNF- α , LPS oder mit einem proinflammatorischen Cocktail für 48 Stunden gereift wurden, resultierte in einem erhöhten Aktivierungsstatus der T_H-Zellen. TNF- α -gereifte moDCs induzierten hierbei einen durchschnittlich 1,55-fach höheren Anteil PKH26-positiver T-Zellen und eine 1,53-fach höhere CD25-Expression im Vergleich zur negativen Kontrollkultur. Bei LPS-gereiften moDCs stieg der Anteil PKH26-positiver Zellen auf das 2,10- und die CD25-Expression auf das 1,92-fache der Kontrolle an. Die stärkste T-Zell-Aktivierung, sowohl in T-Zell-Proliferation (PKH26-positive Zellen) als auch in der Expression des Aktivierungsmarkers CD25, induzierten Cocktail-gereifte moDCs. Hier resultierte die sechstägige Kokultivierung in einer im Mittel um den Faktor 2,15 höheren Proliferation der T_H-Zellen und einem um den Faktor 2,0 höheren Anteil an CD25-exprimierenden Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Diese Werte sind mit denen, die durch die hier verwendete Positivkontrolle induziert wurden, vergleichbar: Eine Stimulation einer Monokultur von T_H-Zellen mit ConA führte zu einer Erhöhung der Proliferation um das 2,46-fache und zu einem Anstieg CD25-exprimierender T_H-Zellen um das 2,06-fache.

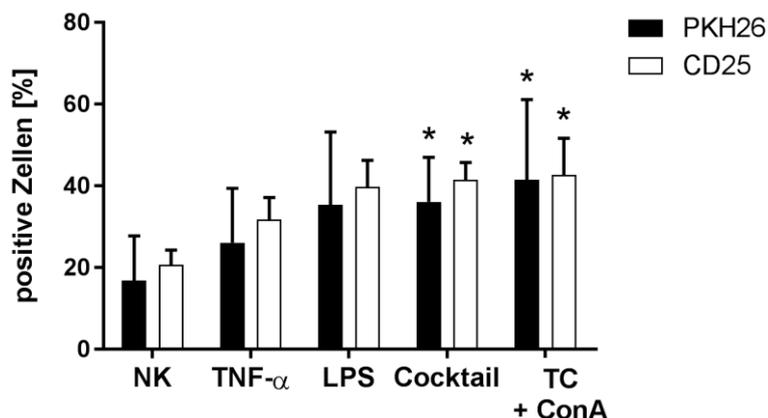


Abbildung 23: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Proliferation (PKH26) und der Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf T_H-Zellen nach sechstägiger Kokultivierung mit spezifisch gereiften moDCs. T_H-Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26 markiert, für sechs Tage mit spezifisch gereiften moDCs kokultiviert und am Durchflusszytometer auf ihre Proliferation und Aktivierung analysiert. Als Negativkontrolle (NK) dienten Kokulturen von T_H-Zellen mit unreifen moDCs. Als Positivkontrolle dienten ConA-behandelte [4 μ g/ml] Monokulturen von T-Zellen (TC+ConA). Die Daten zeigen die arithmetischen Mittelwerte pro Behandlungsgruppe \pm SD (Ktrl, Cocktail: n=7, TNF- α , LPS: n=6, ConA: n=5). Die technischen Triplikate jedes Donors wurden vor durchflusszytometrischer Analyse vereinigt. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließender Dunnett-Korrektur, bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe, ermittelt: * p<0,05.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurde der proinflammatorische Cocktail, bestehend aus TNF- α , IL-1 β , IL-6 und PGE2, als Positivkontrolle für eine Stimulation der moDCs und Aktivierung der T-Lymphozyten etabliert.

3.1.4 Einfluss von Modell-Antigenen auf die Zellen einer Kokultur

Nach erfolgreicher Etablierung eines *in vitro* Kokultursystems aus moDCs und autologen T-Lymphozyten zur Induktion einer T-Zell-Aktivierung (Primärantwort) wurden im Anschluss zwei hoch immunogene Modell-Antigene im Rahmen dieses *in vitro* Systems untersucht. Hierbei handelte es sich um KLH und OVA.

Zunächst wurden moDCs nach etabliertem Standardprotokoll generiert und in Anwesenheit der Antigene KLH und OVA für 48 Stunden gereift. Anschließend erfolgte der Kontakt mit autologen T-Lymphozyten unter erneuter Antigenzugabe für sechs Tage. Sowohl der Einfluss der Proteine auf die Oberflächenmarkerexpression der moDCs als auch auf die T-Zell-Proliferation und CD25-Expression wurde untersucht. Es wurden Produkte verschiedener Hersteller verwendet: KLH der Firma Sigma, nach Herstellerangaben nahezu endotoxinfreies KLH von Merck Millipore (Endotoxingehalt: ≤ 12 EU/mg) und ein KLH der Firma Pierce. Letzteres wurde sowohl im Originalzustand als auch dialysiert eingesetzt. Mittels BCA-Assay wurde die Proteinkonzentration nach Dialyse überprüft. Die Analyse ergab, dass die Dialyse keinen Einfluss auf die Konzentration des Pierce-KLHs hatte und diese somit mit der Konzentration der nicht-dialysierten Form vergleichbar war. Im Fall von OVA wurde das Produkt der Firma Sigma mit dem endotoxinfreien Produkt der Firma Hyglos (EndoGrade®) verglichen.

Ziel war es, gleiche, kommerziell erhältliche Immunogene verschiedener Hersteller auf die Induktion einer Primärantwort innerhalb des *in vitro* Kokultursystems vergleichend zu untersuchen.

Im Rahmen einer erweiterten Kokultur über 16 Tage stand zudem die Analyse der Sekundärantwort auf das Immunogen KLH der Firma Merck Millipore im Vordergrund. Hierzu wurden die T-Lymphozyten der Kokultur weitere zwei Male mit frisch generierten und spezifisch gereiften moDCs desselben Donors restimuliert. Diese Restimulation stellte den Zweitkontakt der T-Zellen mit dem Antigen dar (*Challenge*). Der untersuchte Endpunkt war hier die induzierte Zytokinsekretion.

3.1.4.1 Analyse der Primärantwort auf KLH und OVA

Einfluss von KLH auf die Expression der Oberflächenmarker dendritischer Zellen

Die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker von KLH-gereiften moDCs zeigte deutliche Unterschiede in der Expression der einzelnen Marker in Abhängigkeit vom verwendeten KLH (Sigma, Merck, Pierce, Pierce dialysiert; Abb. 24, 25). Es wurde sowohl eine maximale Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ als auch eine Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ zur Reifung der moDCs eingesetzt.

Nach Reifung mit 100 µg/ml KLH (Abb. 24) zeigte das KLH der Firma Sigma den stärksten Einfluss auf das Oberflächenmarkerprofil. Die Marker CD80, CD83 und CD86 (Abb. 24A) wurden durchschnittlich um ein 1,45-faches ($\pm 0,41$; CD80), um das 1,38-fache ($\pm 0,44$; CD83) sowie um ein 1,55-faches ($\pm 0,65$; CD86) im Vergleich zur Negativkontrolle induziert. Alle drei Oberflächenmarker unterschieden sich signifikant von der Induktion, welche durch die KLHs der Hersteller Merck und Pierce (mit und ohne Dialyse) hervorgerufen wurde.

Nach Reifung der Zellen mit den KLHs der Firmen Merck und Pierce waren die CD80-Expressionen mit der der Negativkontrolle vergleichbar. Die CD83-Expressionen hingegen lagen niedriger als die Expression, die in der Negativkontrolle induziert wurde (Merck: $0,43 \pm 0,17$; Pierce: $0,62 \pm 0,17$; Pierce, dialysiert: $0,70 \pm 0,28$). Auch bei der CD86-Expression wurde durch das KLH von Merck eine geringere Expression als in der Negativkontrolle erreicht ($0,86 \pm 0,15$). Bei Reifungen mit Pierce-KLH (mit und ohne Dialyse) unterschied sich diese kaum von der Negativkontrolle.

Die Reifungen der moDCs mit den KLHs von Sigma, Merck und Pierce (ohne Dialyse) induzierten eine Abnahme der Expression von CD209 (Sigma: $0,84 \pm 0,07$; Merck: $0,89 \pm 0,03$; Pierce, nicht dialysiert: $0,87 \pm 0,16$; Pierce, dialysiert: $0,96 \pm 0,05$; Abb. 24B). Das Sigma-KLH zeigte dabei den stärksten Effekt auf die CD209-Expression, wohingegen sich diese nach Reifung der moDCs mit dialysiertem Pierce-KLH nur minimal von der CD209-Expression in der Negativkontrolle unterschied. Dieser Unterschied zwischen der CD209-Expression auf Sigma-KLH-gereiften und Pierce (dialysiert)-gereiften moDCs war signifikant.

HLA-DR wurde von allen moDCs zu 100 % exprimiert.

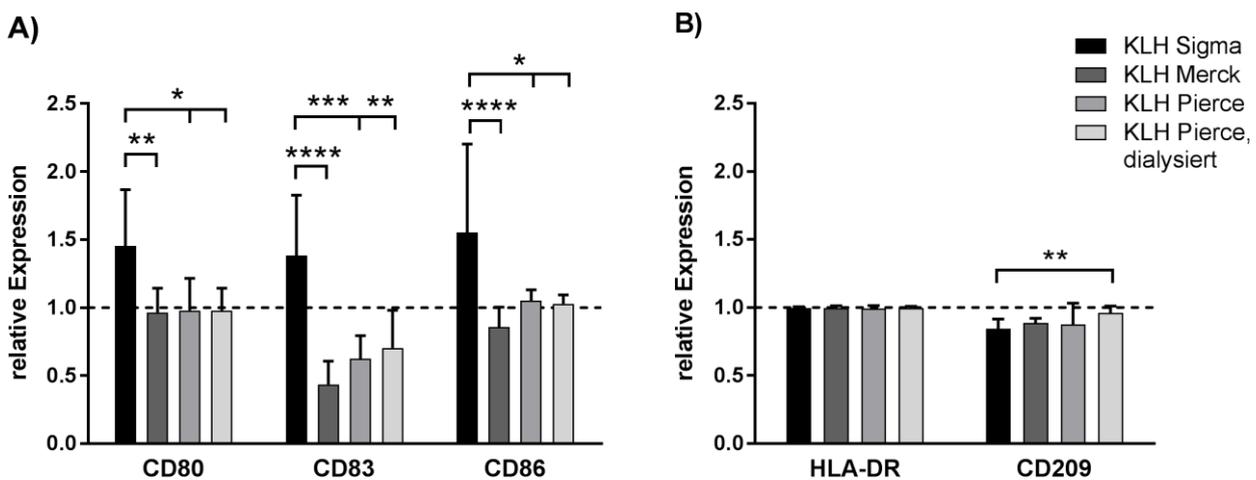


Abbildung 24: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf moDCs nach Reifung mit KLH. DCs wurden für 48 Stunden mit KLHs [100 µg/ml] unterschiedlicher Hersteller (Sigma, Merck, Pierce) gereift und auf ihre Oberflächenmarker analysiert. A) CD80, CD83, CD86. B) HLA-DR, CD209. Die Daten zeigen die mittlere relative Expression der jeweiligen Oberflächenmarker pro Behandlungsgruppe im Vergleich zur Negativkontrolle (mit Zellkulturmedium behandelte Zellen; gestrichelte Linie) \pm SD (Sigma, Merck: n=9; Pierce, Pierce dialysiert: n=5). Die mittlere relative Expression (Verhältnis Behandlung vs. Negativkontrolle) wurde berechnet, indem pro Probe der Quotient zur Negativkontrolle gebildet wurde. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur ermittelt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001 vs. KLH Sigma.

Bei Betrachtung der Daten der mittleren Fluoreszenzintensität von HLA-DR zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem KLH von Merck und dem KLH von Sigma (Abb. 25), während beide Pierce-KLHs keine signifikanten Unterschiede zum Sigma-KLH aufwiesen.

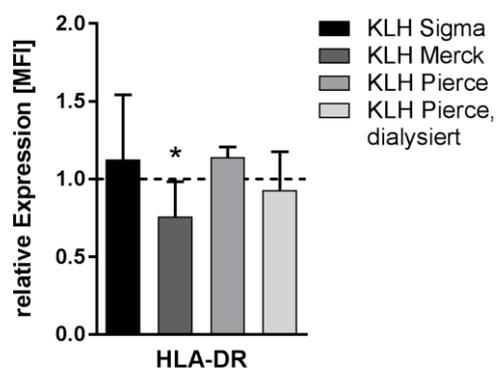


Abbildung 25: Alternative durchflusszytometrische Analyse der HLA-DR-Expression von moDCs nach Reifung mit KLH.

Die Daten zeigen die mittlere relative Expression als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für HLA-DR pro Behandlungsgruppe (100 µg/ml KLH) im Vergleich zur Negativkontrolle (mit Zellkulturmedium behandelte Zellen; gestrichelte Linie) ± SD (Sigma, Merck: n=9; Pierce, Pierce dialysiert: n=5). Die mittlere relative Expression (Verhältnis Behandlung vs. Negativkontrolle) wurde berechnet, indem pro Probe der Quotient zur Negativkontrolle gebildet wurde. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur ermittelt: * p < 0,05 vs. KLH Sigma.

Auch bei Reifungen mit niedrigerer KLH-Konzentration (25 µg/ml; Abb. 26A, B) zeigte Sigma-KLH den stärksten Einfluss auf das Oberflächenmarkerprofil der moDCs. Das Ausmaß der Reaktion fiel im Vergleich zu einer Stimulation mit 100 µg/ml KLH allerdings geringer aus. Die Marker CD80, CD83 und CD86 (Abb. 26A) wurden durchschnittlich um ein 1,32-faches (± 0,31; CD80), um das 1,09-fache (± 0,22; CD83) sowie um ein 1,42-faches (± 0,67; CD86) im Vergleich zur Negativkontrolle induziert. Die CD86-Expression unterschied sich somit signifikant von der Induktion, welche durch die KLHs von Merck und Pierce (mit und ohne Dialyse) hervorgerufen wurde. CD80 und CD83 hingegen unterschieden sich nur noch signifikant von der Expression auf Merck-KLH-gereiften moDCs.

Bei Merck- und Pierce-gereiften (mit und ohne Dialyse) moDCs lag die CD80-Expression im Bereich der Negativkontrolle, die Expression von CD83 darunter (Merck: 0,64 ± 0,23; Pierce, nicht dialysiert: 0,76 ± 0,11; Pierce, dialysiert: 0,81 ± 0,13). Somit induzierte Merck-KLH auch bei niedrigerer Konzentration den geringsten Anteil CD83-positiver moDCs. Auf die CD86-Expression hatten die KLHs von Merck und Pierce (mit und ohne Dialyse) keinen Einfluss.

Die Reifungen der moDCs mit den KLHs von Sigma, Merck und Pierce (mit und ohne Dialyse) induzierten eine Abnahme der Expression von CD209 (Abb. 26B). Diese Abnahme fiel im Vergleich zu einer höheren KLH-Konzentration von 100 µg/ml geringer aus. Auch hier zeigte Sigma-KLH den stärksten Effekt (0,91 ± 0,05) und unterschied sich signifikant vom Einfluss der Merck- und Pierce-KLHs (mit und ohne Dialyse) auf die CD209-Expression. Die Werte der Pierce-KLH-gereiften moDCs waren mit denen der Negativkontrolle vergleichbar (Merck: 0,94 ± 0,04; Pierce, nicht dialysiert: 0,97 ± 0,02). HLA-DR wurde auch hier von allen moDCs zu 100 % exprimiert. Die mittlere Fluoreszenzintensität der HLA-DR-positiven Population zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen KLHs (Daten nicht gezeigt).

Ergänzend wurde im Rahmen dieser Versuche der Einfluss eines zusätzlichen LPS-Stimulus, als *Bystander* einer antigenen Reaktion, auf das Oberflächenmarkerprofil untersucht (Abb. 26C, D). Insgesamt wurde eine größere Veränderung der Oberflächenmarkerexpression bei einer kombinierten Reifung mit KLH und LPS im Vergleich zu einer alleinigen KLH-Reifung der moDCs verzeichnet. Einzige Ausnahme war auch hier HLA-DR. Dieser Oberflächenmarker wurde von allen moDCs zu 100 % exprimiert. Anders als bei alleiniger KLH-Reifung, ergab eine kombinierte Reifung der moDCs mit KLH und *Bystander* keine signifikanten Unterschiede in der Expression der verschiedenen Oberflächenmarker zwischen den einzelnen KLHs der verschiedenen Hersteller. Darüber hinaus waren keine signifikanten Unterschiede im Oberflächenmarkerprofil zwischen KLH+LPS-gereiften und nur mit LPS gereiften moDCs zu verzeichnen.

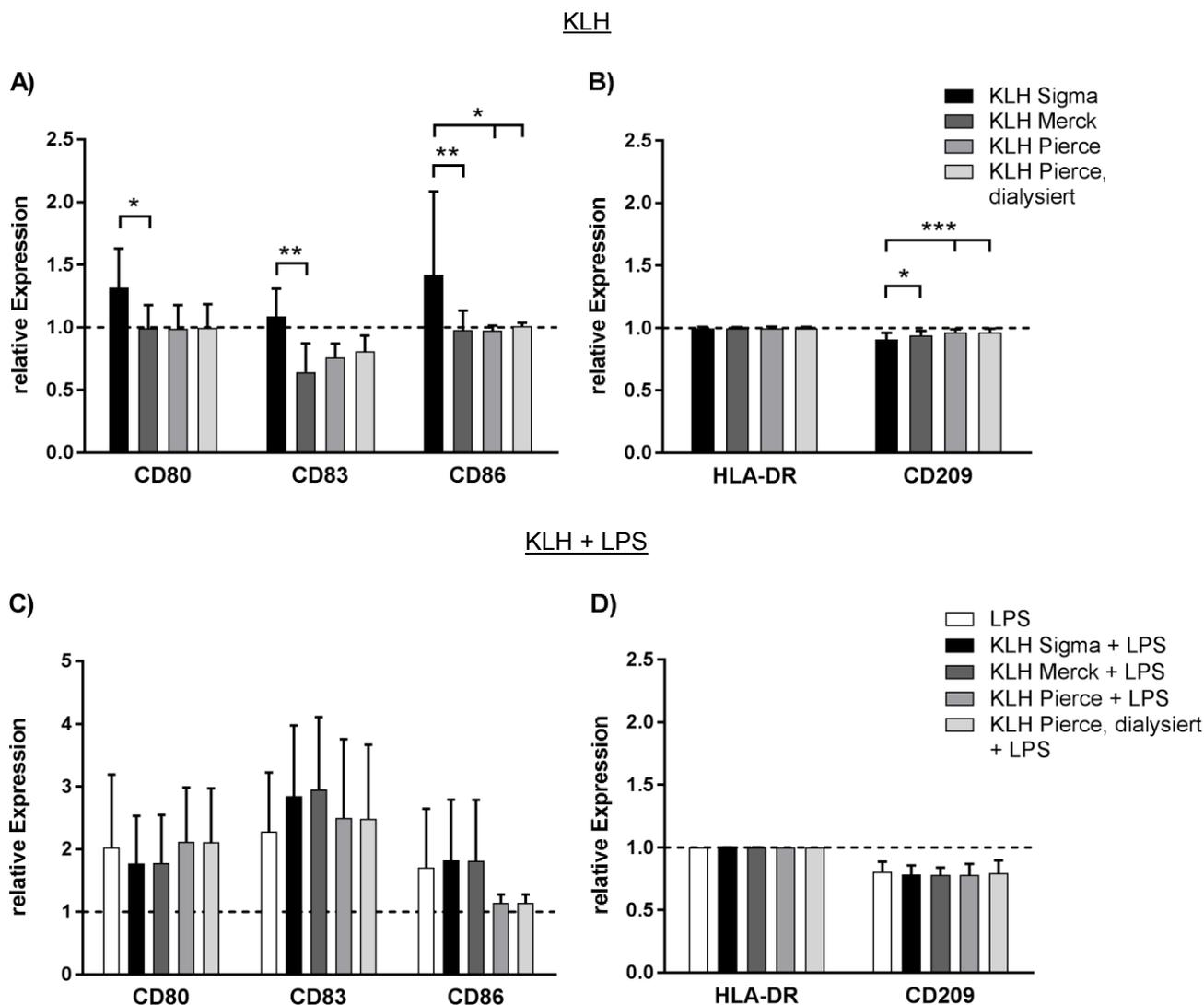


Abbildung 26: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf moDCs nach Reifung mit KLH +/- LPS. DCs wurden für 48 Stunden mit KLH verschiedener Hersteller (Sigma, Merck, Pierce) +/- LPS gereift und auf ihre Oberflächenmarker analysiert. A, C) CD80, CD83, CD86. B, D) HLA-DR, CD209. A, B) KLH [25 µg/ml] C, D) KLH [25 µg/ml] + LPS [0,2 µg/ml]. Die Daten zeigen die mittlere relative Expression der jeweiligen Oberflächenmarker pro Behandlungsgruppe im Vergleich zur Negativkontrolle (mit Zellkulturmedium behandelte Zellen; gestrichelte Linie) \pm SD (Sigma, Merck: n=11; Pierce, Pierce dialysiert: n=6; Sigma + LPS, Merck + LPS: n=7; Pierce + LPS, Pierce dialysiert + LPS: n=4; LPS: n=6). Die mittlere relative Expression (Verhältnis Behandlung vs. Negativkontrolle) wurde berechnet, indem pro Probe der Quotient zur Negativkontrolle gebildet wurde. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur ermittelt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001 vs. KLH Sigma.

Zusammenfassend lässt sich herausstellen, dass der Unterschied in den Expressionen der einzelnen Oberflächenmarker zwischen einer Reifung der moDCs mit Sigma-KLH und der mit Merck-KLH am größten war. Sigma-KLH hatte im Durchschnitt den stärksten Einfluss auf die Expression, wohingegen Pierce-KLH-gereifte moDCs (mit und ohne Dialyse) ein ähnliches Oberflächenmarkerprofil aufwiesen wie die unreifen moDCs der Negativkontrolle. Ein Unterschied zwischen nicht-dialysiertem und dialysiertem Pierce-KLH konnte nicht ausgemacht werden. Im Vergleich zu reinen KLH-Reifungen der moDCs induzierte ein zusätzlicher LPS-Stimulus als *Bystander* eine gesteigerte Expression der Oberflächenmarker. Hier konnten

schließlich keine Unterschiede zwischen den KLHs unterschiedlicher Hersteller mehr verzeichnet werden.

Einfluss von KLH auf die T_H-Zell-Aktivierung

Um den Einfluss der verschiedenen KLHs auf eine T_H-Zell-Aktivierung zu analysieren, wurden KLH-gereifte moDCs mit autologen T-Lymphozyten kokultiviert. Das KLH der Firma Merck wurde mit dem von Sigma verglichen (Abb. 27), da hier in den vorangegangenen Experimenten zur Analyse der Oberflächenmarkerexpressionen die größten Unterschiede verzeichnet wurden. Endpunkte der Analyse waren die T-Zell-Proliferation (PKH26-positive Zellen; Abb. 27A) sowie der Anteil CD25-positiver T-Zellen (Abb. 27B) nach Kokultivierung.

Die mittlere Proliferation von T-Lymphozyten lag nach Kokultivierung mit Merck-KLH-gereiften moDCs im Bereich der Negativkontrolle und zeigte keine konzentrationsabhängigen Effekte ($1,04 \pm 0,32$ [25 µg/ml]; $0,90 \pm 0,17$ [100 µg/ml]). Ein kombinierter Stimulus aus Merck-KLH [25 µg/ml] und LPS während der Reifung der moDCs induzierte eine T-Zell-Proliferation, die ein 1,72-faches ($\pm 0,32$) über der Negativkontrolle lag. Diese war somit höher als die Proliferation der T-Zellen nach Kokultivierung mit 25 µg/ml und 100 µg/ml Merck-KLH-gereiften moDCs (ohne zusätzlichen LPS-Stimulus) und niedriger als die T-Zell-Proliferation in den Kokulturen mit LPS-gereiften moDCs (2,08-fache der Negativkontrolle $\pm 0,17$). Die mittlere CD25-Expression von T-Lymphozyten lag nach Kokultivierung mit Merck-KLH-gereiften moDCs über der Expression der Zellen der Negativkontrolle ($1,20 \pm 0,25$ [25 µg/ml]; $1,11 \pm 0,30$ [100 µg/ml]). Ein zusätzlicher LPS-Stimulus erhöhte diese auf ein 1,8-faches der Negativkontrolle ($\pm 0,19$). Die Induktion der CD25-Expression durch eine Kokultur von T-Zellen mit LPS-gereiften moDCs wurde durch diesen kombinierten Stimulus jedoch auch hier nicht überschritten ($2,17 \pm 0,66$).

Sigma-KLH zeigte auch bei den Parametern der T-Zell-Aktivierung konzentrationsabhängige Effekte. Die mittlere Proliferation stieg durchschnittlich vom 2,20-fachen ($\pm 0,76$; 25 µg/ml) auf das 3,13-fache ($\pm 1,41$; 100 µg/ml) der Negativkontrolle an. Beide Induktionen der Proliferation unterschieden sich somit signifikant von denen der korrespondierenden Kokulturen mit Merck-KLH. Ein zusätzlicher LPS-Stimulus während der Reifung der moDCs mit Sigma-KLH hatte keine weiteren Auswirkungen auf die T-Zell-Proliferation (Induktion: 2,18-fache der Negativkontrolle $\pm 0,68$) im Vergleich zur Proliferation nach Kokultivierung mit Sigma-KLH-gereiften moDCs (25 µg/ml) und lag minimal über der nach Kokultivierung mit LPS-gereiften moDCs (2,08-fache der Negativkontrolle $\pm 0,17$). Bei der CD25-Expression verhielt es sich ähnlich. Auch hier induzierten Sigma-KLH-gereifte moDCs eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Expression auf T-Lymphozyten (von $1,76 \pm 0,25$ [25 µg/ml] auf $3,56 \pm 2,42$ [100 µg/ml]). Die CD25-Expression auf T-Zellen der Kokultur mit 100 µg/ml Sigma-KLH-gereiften moDCs unterschied sich signifikant von der Expression der T-Zellen der korrespondierenden Kokulturen mit Merck-KLH. Eine kombinierte Reifung der moDCs mit

Sigma-KLH [25 µg/ml] und LPS hatte einen induzierenden Effekt auf die CD25-Expression von T-Zellen (Induktion: 2,11-fache der Negativkontrolle ± 0,38) im Vergleich zur alleinigen KLH-Reifung (25 µg/ml; siehe oben: 1,76-fache der Negativkontrolle ± 0,25). Diese 2,11-fache Induktion war vergleichbar mit der von T-Zellen aus einer Kokultur mit LPS-gereiften moDCs (2,17-fache der Negativkontrolle ± 0,66).

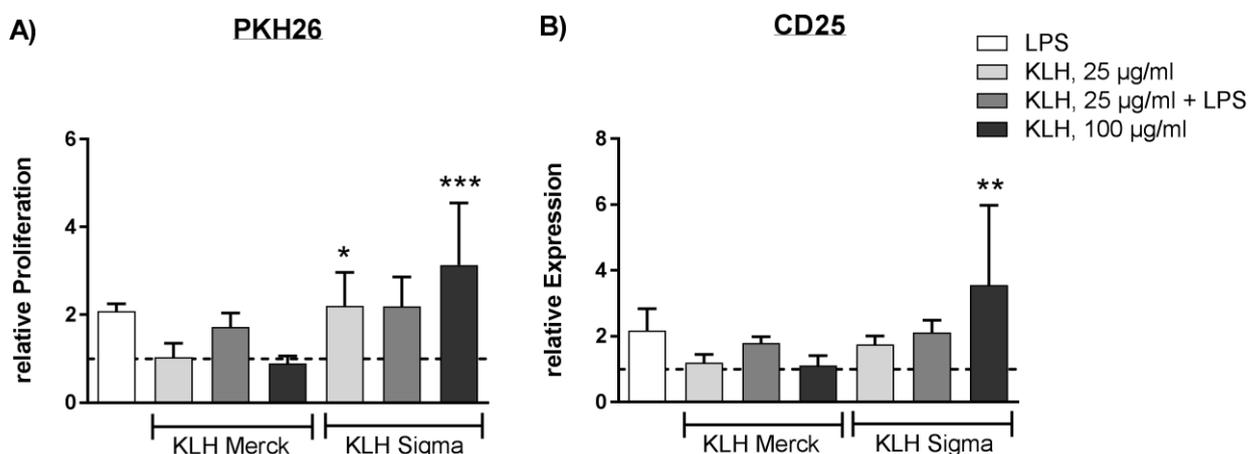


Abbildung 27: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Proliferation (PKH26) und der Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf T_H-Zellen nach sechstägiger Kokultivierung mit KLH- (+/- LPS) gereiften moDCs. A) Proliferation (PKH26). B) CD25-Expression. T_H-Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26 markiert, für sechs Tage mit KLH- (+/- LPS) gereiften moDCs kokultiviert und am Durchflusszytometer auf ihre Proliferation und CD25-Expression analysiert. Die technischen Triplikate jedes Donors wurden vor durchflusszytometrischer Analyse vereinigt. Die Daten zeigen die mittlere relative Proliferation bzw. CD25-Expression pro Behandlungsgruppe im Vergleich zur Negativkontrolle (Kokulturen von T_H-Zellen mit unreifen moDCs; gestrichelte Linie) ± SD (PKH26: LPS, KLH [25 µg/ml]: n=6; KLH [25 µg/ml] + LPS, KLH [100 µg/ml]: n=4; CD25: KLH [25 µg/ml]: n=5; LPS, KLH [25 µg/ml] + LPS, KLH [100 µg/ml]: n=4). Die mittlere relative Proliferation bzw. Expression (Verhältnis Behandlung vs. Negativkontrolle) wurde berechnet, indem pro Probe der Quotient zur Negativkontrolle gebildet wurde. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur, bezogen auf den korrespondierenden Ansatz des Merck-KLHs, ermittelt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Es lässt sich zusammenfassen, dass eine Kokultivierung von T-Lymphozyten mit Sigma-KLH-gereiften moDCs, unabhängig von KLH-Konzentration und analysiertem Endpunkt, die höchsten Induktionen erzeugte. Im Gegensatz zu einer Kokultur mit Merck-gereiften moDCs zeigten diese Induktionen zudem konzentrationsabhängige Effekte. Verglichen mit einer alleinigen KLH-Reifung wirkte sich eine kombinierte Reifung der moDCs mit KLH und LPS nach anschließender Kokultivierung zwar aktivierend auf die T_H-Zellen aus (Sigma-KLH: CD25-Expression; Merck-KLH: T-Zell-Proliferation und CD25-Expression), überstieg die Induktionen, die durch eine Kokultur mit LPS-gereiften moDCs erreicht wurden, jedoch nicht signifikant.

Einfluss von OVA auf die Expression der Oberflächenmarker dendritischer Zellen

Die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker von OVA-gereiften moDCs ließ ebenfalls deutliche Unterschiede in der Expression der einzelnen Marker in Abhängigkeit vom

verwendeten OVA erkennen (Abb. 28). Es wurden OVA-Produkte der Firmen Sigma und Hyglos in Konzentrationen von 1 – 100 µg/ml untersucht und miteinander verglichen. Das OVA der Firma Sigma zeigte einen stärkeren Einfluss auf die Expression der analysierten Oberflächenmarker der moDCs im Vergleich zum OVA der Firma Hyglos. Während bei Sigma-OVA ein deutlicher konzentrationsabhängiger Effekt auf die Expression der einzelnen Marker verzeichnet werden konnte, induzierte Hyglos-OVA keinen solchen Effekt.

Eine Reifung der moDCs mit Hyglos-OVA hatte keinen Einfluss auf die Marker CD80 und CD209 (Abb. 28A, B). Ihre Expressionen befanden sich, unabhängig von der eingesetzten OVA-Konzentration, im Bereich der Negativkontrolle. Die Expressionen der Oberflächenmarker CD83 und CD86 lagen nach Reifung mit Hyglos-OVA über die gesamte Konzentrationsspanne hinweg unterhalb der Negativkontrolle (Abb. 28A). HLA-DR wurde von allen moDCs zu 100 % exprimiert (Abb. 28B).

Eine Reifung der moDCs mit steigenden Konzentrationen Sigma-OVA resultierte in einer konzentrationsabhängig erhöhten Expression der Marker CD80, CD83 und CD86 (Abb. 28A). Die CD80-Expression nahm durchschnittlich vom 1,56-fachen ($\pm 0,51$) der Negativkontrolle bei 1 µg/ml bis auf ein 4,02-faches ($\pm 3,28$) bei maximaler OVA-Konzentration (100 µg/ml) zu. Während die CD83-Expression bei niedrigster Konzentration von Sigma-OVA (1 µg/ml) noch im Bereich der Negativkontrolle lag (Induktion: 0,92-fache $\pm 0,20$), wurde dieser Marker mit zunehmender OVA-Konzentration durchschnittlich um das 2,13- ($\pm 0,37$; 10 µg/ml) bzw. 2,98-fache ($\pm 0,17$; 100 µg/ml) der Negativkontrolle verstärkt exprimiert. Auch auf CD86 hatte die niedrigste OVA-Konzentration von 1 µg/ml im Vergleich zur Negativkontrolle keinen Einfluss. Bei höheren Konzentrationen konnte ein Anstieg bis auf das 1,18-fache ($\pm 0,18$; 100 µg/ml) der Negativkontrolle gemessen werden. Die mittlere CD209-Expression hingegen wurde mit steigender Sigma-OVA-Konzentration konzentrationsabhängig herunterreguliert (von $0,98 \pm 0,06$ [1 µg/ml] auf $0,74 \pm 0,06$ [100 µg/ml]; Abb. 28B).

Alle Effekte auf die Expression der Oberflächenmarker CD80 und CD209 (Abb. 28A, B), die durch Sigma-OVA in den Konzentrationen 10 µg/ml und 100 µg/ml erzielt wurden, waren somit signifikant gegenüber denen, die nach Reifung mit den korrespondierenden Konzentrationen Hyglos-OVA induziert wurden. Die CD83-Expression zeigte erst bei maximaler Konzentration von Sigma-OVA eine signifikante Induktion im Vergleich zur CD83-Expression bei maximaler Konzentration von Hyglos-OVA.

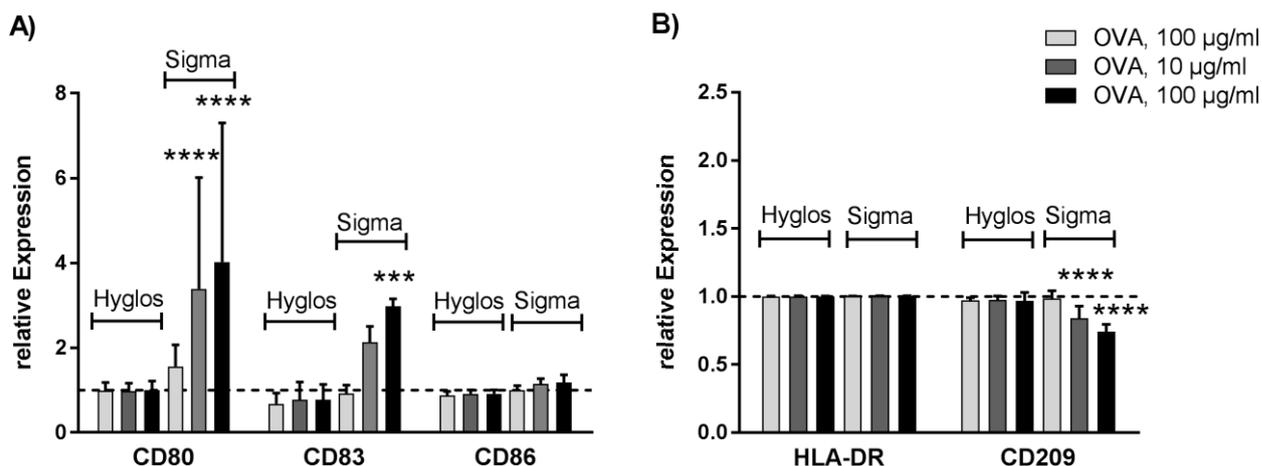


Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf moDCs nach Reifung mit OVA. DCs wurden für 48 Stunden mit OVA [1 µg/ml; 10 µg/ml; 100 µg/ml] verschiedener Hersteller (Sigma, Hyglos) gereift und auf ihre Oberflächenmarker analysiert. A) CD80, CD83, CD86. B) HLA-DR, CD209. Die Daten zeigen die mittlere relative Expression der jeweiligen Oberflächenmarker pro Behandlungsgruppe im Vergleich zur Negativkontrolle (mit Zellkulturmedium behandelte Zellen; gestrichelte Linie) \pm SD (Hyglos: n=8; Sigma: n=3). Die mittlere relative Expression (Verhältnis Behandlung vs. Negativkontrolle) wurde berechnet, indem pro Probe der Quotient zur Negativkontrolle gebildet wurde. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur, bezogen auf den korrespondierenden Ansatz des Hyglos-OVAs, ermittelt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001.

Um genauere Informationen über den Einfluss der zwei verschiedenen OVAs auf die HLA-DR-Expression zu erhalten, wurde zusätzlich zu den prozentualen Werten die mittlere Fluoreszenzintensität analysiert (Abb. 29). Auch hier induzierte Sigma-OVA eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Expression vom 1,23-fachen (\pm 0,22; 1 µg/ml) auf das 2,12-fache (\pm 0,52; 100 µg/ml) der Negativkontrolle. Diese Induktion war bei Konzentrationen von 10 µg/ml und 100 µg/ml signifikant gegenüber den korrespondierenden Hyglos-OVA Ansätzen, welche unterhalb der Negativkontrolle lagen.

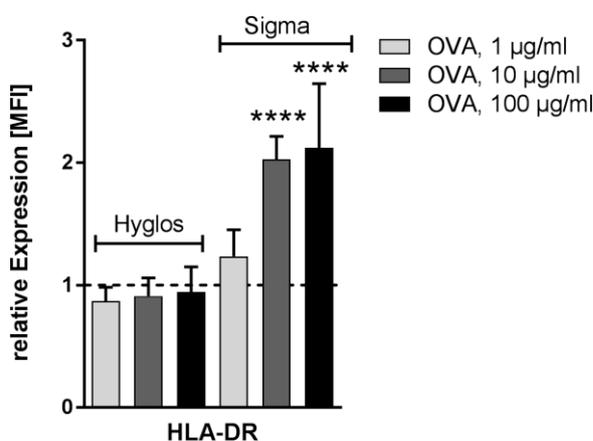


Abbildung 29: Alternative durchflusszytometrische Analyse der HLA-DR-Expression von moDCs nach Reifung mit OVA. Die Daten zeigen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der relativen Expression von HLA-DR pro Behandlungsgruppe im Vergleich zur Negativkontrolle (mit Zellkulturmedium behandelte Zellen; gestrichelte Linie) \pm SD (Hyglos: n=8; Sigma: n=3). Die mittlere relative Expression (Verhältnis Behandlung vs. Negativkontrolle) wurde berechnet, indem pro Probe der Quotient zur Negativkontrolle gebildet wurde. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur, bezogen auf den korrespondierenden Ansatz des Hyglos-OVAs, ermittelt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001.

Einfluss von OVA auf die T_H-Zell-Aktivierung

Auch im Fall des Immunogens OVA wurden die OVA-gereiften moDCs mit autologen T-Lymphozyten kokultiviert und ihr Einfluss auf die T_H-Zell-Aktivierung analysiert. Es wurde das OVA der Firma Sigma mit dem der Firma Hyglos verglichen (Abb. 30).

Nach Kokultivierung von T-Lymphozyten mit Hyglos-OVA-gereiften moDCs wurde eine maximale Proliferation bei niedrigster OVA-Konzentration detektiert ($5,09 \pm 5,09$; 1 $\mu\text{g/ml}$), die konzentrationsabhängig bis auf das 1,19-fache der Negativkontrolle abnahm ($\pm 0,30$; 100 $\mu\text{g/ml}$; Abb. 30A). Die mittlere CD25-Expression der T-Zellen verblieb über die gesamte Konzentrationsspanne hinweg unterhalb der Negativkontrolle ($0,57 \pm 0,20$ [1 $\mu\text{g/ml}$]; $0,89 \pm 1,08$ [10 $\mu\text{g/ml}$]; $0,87 \pm 0,55$ [100 $\mu\text{g/ml}$]; Abb. 30B).

Sigma-OVA zeigte auch bei den Parametern der T-Zell-Aktivierung konzentrationsabhängige Effekte. Die mittlere Proliferation stieg vom 2,11-fachen ($\pm 0,96$; 1 $\mu\text{g/ml}$) auf das 4,89-fache ($\pm 3,51$; 100 $\mu\text{g/ml}$) der Negativkontrolle an (Abb. 30A). Die mittlere CD25-Expression (Abb. 30B) befand sich bei einer Sigma-OVA Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ unterhalb der Expression der T-Lymphozyten der Negativkontrolle ($0,83 \pm 0,94$) und stieg mit zunehmender OVA-Konzentration auf das 2,75-fache ($\pm 2,47$) bei 10 $\mu\text{g/ml}$ bzw. auf das 2,88-fache ($\pm 1,94$) bei 100 $\mu\text{g/ml}$ an.

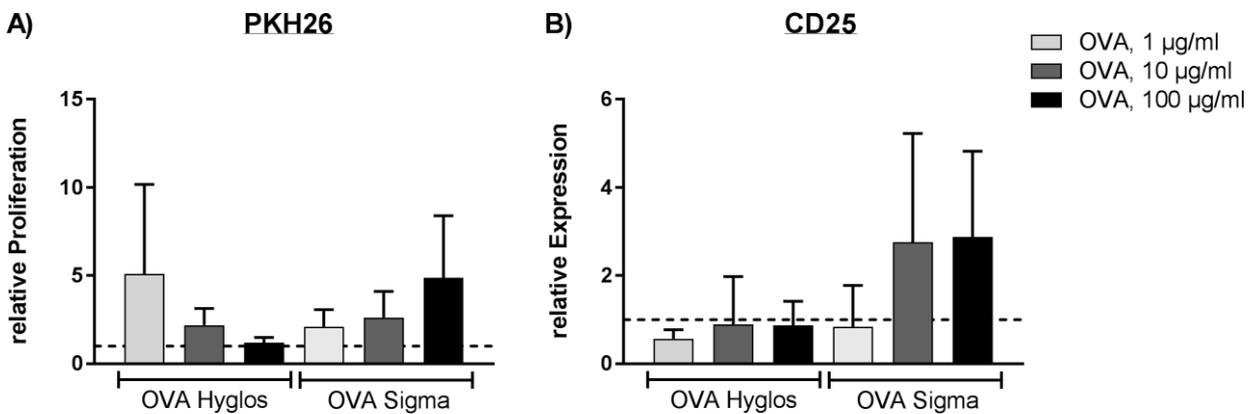


Abbildung 30: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Proliferation (PKH26) und der Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf T_H-Zellen nach sechstägiger Kokultivierung mit OVA-gereiften moDCs. A) Proliferation (PKH26). B) CD25-Expression. T_H-Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26 markiert, für sechs Tage mit OVA-gereiften moDCs kokultiviert und am Durchflusszytometer auf ihre Proliferation und CD25-Expression analysiert. Die technischen Triplikate jedes Donors wurden vor durchflusszytometrischer Analyse vereinigt. Die Daten zeigen die mittlere relative Proliferation bzw. CD25-Expression pro Behandlungsgruppe im Vergleich zur Negativkontrolle (Kokulturen von T_H-Zellen mit unreifen moDCs; gestrichelte Linie) \pm SD (Hyglos: n=4; Sigma: n= 2). Die mittlere relative Proliferation bzw. Expression (Verhältnis Behandlung vs. Negativkontrolle) wurde berechnet, indem pro Probe der Quotient zur Negativkontrolle gebildet wurde. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur, bezogen auf den korrespondierenden Ansatz des Hyglos-OVAs, ermittelt.

Die vorliegenden Experimente zeigen, dass eine Kokultivierung von T-Lymphozyten mit Sigma-OVA-gereiften moDCs, im Vergleich zu einer Kokultur mit Hyglos-OVA-gereiften moDCs, den

größeren Einfluss sowohl auf die Expression der Oberflächenmarker der moDCs als auch auf eine T-Zell-Aktivierung hatte. Zudem induzierte Sigma-OVA, im Gegensatz zu Hyglos-OVA, konzentrationsabhängige Effekte. Folglich sind die von Sigma-OVA induzierten Effekte und Effektstärken mit denen des Sigma-KLHs vergleichbar. Die von Hyglos-OVA induzierten Reaktionen wiederum ähneln denen des Merck-KLHs. Eine Betrachtung der exemplarischen durchflusszytometrischen Analysen untermauert diese Aussage (Abb. 31).

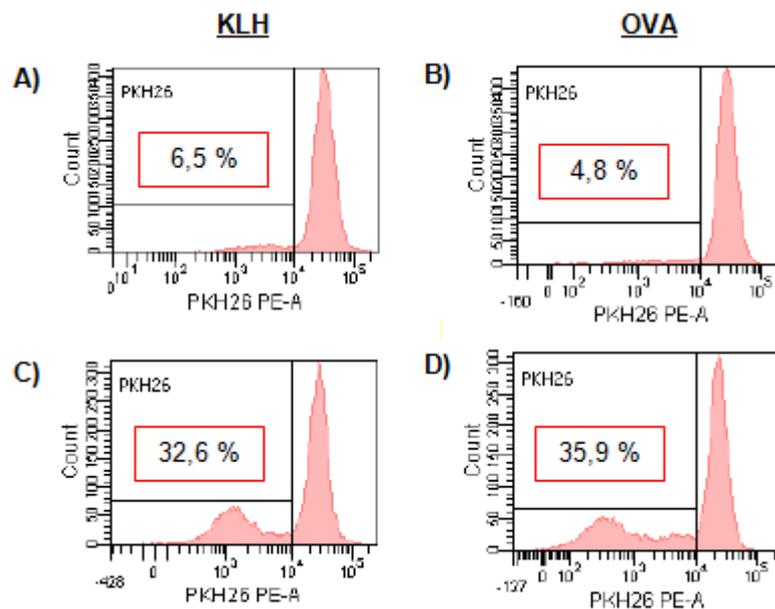


Abbildung 31: Exemplarische Histogramme einer durchflusszytometrischen Analyse der Proliferation von $CD4^+$ T_H -Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26 an Tag 6 einer Kokultur mit spezifisch gereiften moDCs. Histogramme der PKH26-Analyse von T_H -Zellen einer Kokultur mit Merck-KLH- (A), Hyglos-OVA- (B), Sigma-KLH- (C) und Sigma-OVA-gereiften moDCs (D) an Tag 6. Die technischen Triplikate wurden vor durchflusszytometrischer Analyse vereinigt.

Auch im Rahmen dieser Versuche wurde eine zusätzliche Stimulation mit einer *Bystander*-Substanz (TNF- α [20 ng/ml]) untersucht, die bei Reifung der moDCs zeitgleich mit dem Antigen zugesetzt wurde (Daten nicht gezeigt). Unabhängig von der eingesetzten Hyglos-OVA-Konzentration verstärkte diese kombinierte Reifung der moDCs mit Hyglos-OVA und TNF- α den Effekt auf die Expression der Oberflächenmarker im Vergleich zu einer alleinigen Hyglos-OVA-Reifung. Die Expressionslevel lagen im gleichen Bereich wie die, die durch eine alleinige TNF- α -Stimulation erreicht wurden. Im Gegensatz hierzu zeigte eine zeitgleiche Reifung der moDCs mit Sigma-OVA und TNF- α keine erhöhte Oberflächenmarkerexpression im Vergleich zu einer alleinigen Reifung mit Sigma-OVA. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den OVAs der unterschiedlichen Hersteller mehr verzeichnet werden. Zudem waren die induzierten Effekte sowohl nach alleiniger Sigma-OVA Reifung als auch nach kombinierter Reifung stärker als nach alleiniger TNF- α -Reifung. Gleiche Auswirkungen hatte die kombinierte Reifung der moDCs auf die T-Zell-Aktivierung.

Es lässt sich zusammenfassen, dass zusätzlich verschiedene *Bystander*-Substanzen, wie LPS (2 µg/ml; Abb. 26) und TNF-α (20 ng/ml), getestet wurden. Allerdings erwies sich die Titration einer optimalen *Bystander*-Konzentration als sehr aufwendig und die Ergebnisse als so komplex, dass dieser Weg nicht weiter verfolgt wurde. Es kann jedoch festgehalten werden, dass es möglich ist, *Bystander*-Substanzen zeitgleich mit dem Antigen zur Reifung der moDCs zuzusetzen und somit die Aktivierung der moDCs und folglich auch die Aktivierung von autologen T-Zellen innerhalb einer anschließenden Kokultur zu steigern.

3.1.4.2 Untersuchung der Modell-Antigene auf Endotoxine

Ein abschließender Monozyten-Aktivierungstest zur Analyse des Endotoxingehaltes der unterschiedlichen KLH- und OVA-Produkte ergab deutliche Unterschiede in ihrer Reinheit (Tab. 9). Während sich die Endotoxingehalte des KLHs und OVAs der Firma Sigma am obersten Detektionslimit des Messsystems befanden (>2,1 EU/ml), konnte in den übrigen Produkten keine Verunreinigung nachgewiesen werden (0,0 EU/ml).

Tabelle 9: Endotoxingehalt verschiedener KLH- und OVA-Produkte im Vergleich. Der Endotoxingehalt [EU/ml] der verschiedenen KLH- (KLH Sigma, KLH Merck, KLH Pierce, KLH Pierce dialysiert) und OVA-Produkte (OVA Sigma, OVA Hyglos) wurde mittels Monozyten-Aktivierungstest (*PyroDetect System*®) bestimmt (n=3). Die Daten zeigen die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente (KLH) bzw. eines Experimentes (OVA).

Substanz	Endotoxingehalt [EU/ml]
KLH Sigma	> 2,1
KLH Merck	0,0
KLH Pierce	0,0
KLH Pierce, dialysiert	0,0
OVA Sigma	> 2,1
OVA Hyglos	0,0

Die Ergebnisse des Pyrogentests unterstreichen die Ergebnisse zu den Einflüssen der einzelnen Substanzen auf die Oberflächenmarkerexpression von DCs und die T_H-Zell-Aktivierung innerhalb des *in vitro* Kokultursystems. Somit weisen die Modell-Antigene mit dem stärksten Einfluss auf die kokultivierten Zellen auch den höchsten Endotoxin-Gehalt auf (KLH Sigma, OVA Sigma). Vergleichend hierzu hatten die pyrogenfreien Modell-Antigene einen deutlich schwächeren bis gar keinen Einfluss auf die Oberflächenmarkerexpression der DCs und auf eine anschließende T-Zell-Aktivierung.

3.1.4.3 Analyse der Sekundärantwort auf KLH

Erweiterte Kokultur von T-Zellen mit autologen dendritischen Zellen

In den vorangegangenen Experimenten stellten sich die analysierten Endpunkte zur T-Zell-Aktivierung (Proliferation und CD25-Expression) für eine *in vitro* Analyse der Induktion einer primären Immunantwort durch die pyrogenfreien immunogenen Modell-Antigene KLH und OVA als nicht sensitiv genug heraus. Somit wurde in den folgenden Experimenten mit Merck-KLH die induzierte Zytokinsekretion betrachtet. Darüber hinaus wurde der Kultivierungszeitraum auf eine Dauer von 16 Tagen erweitert. Innerhalb dieser Zeit erfolgte eine zweimalige Restimulation (*Challenge*) der kokultivierten Zellen. Hierfür wurden im Abstand von je einer Woche (Tag 7 und Tag 14) frisch generierte, KLH-gereifte moDCs desselben Donors und zusätzliches Antigen (KLH) in löslicher Form der Kokultur hinzugefügt. Um einen möglichen spezifischen Effekt des löslichen KLHs auf das Zytokinprofil herauszustellen, wurde ein Kokulturansatz mitgeführt, bei dem die Restimulation lediglich auf KLH-gereiften moDCs basierte. Monokulturen von KLH-gereiften moDCs und CD4⁺ T-Zellen dienten als Kontrollansätze. Die CD4⁺ T-Zellen wurden hierbei zu den Zeitpunkten der Restimulation lediglich mit dem löslichen Antigen stimuliert, während die Restimulation der Monokulturen der spezifisch gereiften moDCs mit weiteren KLH-gereiften moDCs und löslichem Antigen erfolgte. Ziel dieser erweiterten Kokultur war die Detektion einer antigenspezifischen Sekundärantwort auf das Immunogen KLH der Firma Merck Millipore. Der Einfachheit halber wird im Folgenden die Restimulation mit KLH-gereiften moDCs und löslichem KLH als „vollständige Restimulation“ betitelt. Die „zellbasierte Restimulation“ wiederum beschreibt eine Restimulation mit KLH-gereiften moDCs ohne zusätzliches lösliches Antigen.

Bei den Kokulturen ließ sich im zeitlichen Verlauf von Tag 1 bis Tag 7 (vor Restimulation) ein Konzentrationsanstieg der sezernierten Zytokine IFN- γ , IL-10 und IL-6 verzeichnen (Abb. 32; blaue Linien). Für IL-2 zeigte sich eine maximale Konzentration an Tag 1 der Kultur, welche bis Tag 7 kontinuierlich abnahm. Diese Zytokinkonzentrationen lagen über denen der Monokulturen von KLH-gereiften moDCs (Abb. 32; schwarze Linien). Die anfängliche TNF- α -Ausschüttung von Tag 1 war an Tag 7 nicht mehr zu detektieren. Mit Ausnahme von IL-2 zeigten die verschiedenen Ansätze der übrigen Zytokine (IFN- γ , IL-10, IL-6 und TNF- α) zur vollständigen (blaue Linien) und zur zellbasierten Restimulation (graue Linien) einen ähnlichen Verlauf. Beide Ansätze resultierten am Tag nach der Restimulation bei diesen Zytokinen in Peak-Konzentrationen (Tag 8 und Tag 15). Im zeitlichen Verlauf nahm die Konzentration wieder kontinuierlich ab, verblieb jedoch zu jedem Zeitpunkt nach erster Restimulation oberhalb der Konzentration, die zum Start der Kokultur (Tag 1) sezerniert wurde. Bis auf IFN- γ lagen die jeweiligen Zytokinkonzentrationen nach zellbasierter Restimulation sowohl an Tag 8 als auch an Tag 15 unterhalb den Konzentrationen, die durch eine vollständige Restimulation induziert

wurden. Die IFN- γ -Konzentration nach erster zellbasierter Restimulation hingegen überschritt die Konzentration nach erster vollständiger Restimulation geringfügig.

Der IL-2-Gehalt betrug zu Beginn der Kokultur (Tag 1) 71,82 pg/ml und nahm im zeitlichen Verlauf auf 0,00 pg/ml an Tag 7 vor Restimulation ab. Im Fall der zellbasierten Restimulation wurde kein erneuter Anstieg der IL-2-Konzentration im weiteren zeitlichen Verlauf detektiert (0,00 pg/ml). Die erste vollständige Restimulation induzierte einen Anstieg der Konzentration auf maximal 1,48 pg/ml (Tag 9). Nach zweiter vollständiger Restimulation wurde an Tag 15 eine Peak-Konzentration von 15,19 pg/ml detektiert.

Die Konzentration von IFN- γ lag zum Start der Kokultur (Tag 1) bei 33,95 pg/ml und stieg im zeitlichen Verlauf auf bis zu 1529,36 pg/ml (Tag 7, vor Restimulation) an. Die Peak-Konzentrationen betragen nach vollständiger Restimulation 6513,73 pg/ml (Tag 8) und 75372,94 pg/ml (Tag 15). Dies entspricht einer 49,3-fachen Induktion der IFN- γ -Sekretion an Tag 15 im Vergleich zu Tag 7 vor erster Restimulation. Die zellbasierte Restimulation resultierte in maximalen Konzentrationen von 9806,88 pg/ml (Tag 8) und 20671,77 pg/ml (Tag 15), was einer 13,5-fachen Induktion (Tag 15 vs. Tag 7 vor Restimulation) gleichkommt. Alle IFN- γ Konzentrationen lagen ab Tag 7 über dem Quantifizierungslimit des MSD-Systems (*Upper Limit of Quantification; ULOQ*).

Die IL-10 Konzentration lag zu Beginn der Kokultur (Tag 1) bei 3,35 pg/ml und stieg im zeitlichen Verlauf auf 10,53 pg/ml (Tag 7, vor Restimulation) an. Eine erste vollständige Restimulation an Tag 7 resultierte in einer IL-10-Konzentration von 38,05 pg/ml (Tag 8), eine zweite in einer Konzentration von 29,74 pg/ml. Die induzierten IL-10-Sekretionen nach zellbasierter Restimulation unterschritten diese Werte sowohl an Tag 8 als auch an Tag 15 minimal (Tag 8: 22,72 pg/ml; Tag 15: 26,66 pg/ml).

Die Sekretion von IL-6 betrug nach 24-stündiger Kokultur (Tag 1) 7,45 pg/ml und stieg im zeitlichen Verlauf auf 31,60 pg/ml (Tag 7, vor Restimulation) an. Eine vollständige Restimulation führte zu einem weiteren Anstieg der Konzentration auf 125,04 pg/ml an Tag 8 (nach erster Restimulation) und auf 24,99 pg/ml an Tag 15 (nach zweiter Restimulation). Die durch eine zellbasierte Restimulation induzierten IL-6-Ausschüttungen waren mit 78,80 pg/ml (Tag 8) und 20,12 pg/ml (Tag 15) niedriger.

TNF- α wurde an Tag 1 der Kokultur in einer Konzentration von 34,81 pg/ml detektiert. Diese Konzentration nahm bis Tag 7 (vor Restimulation) auf 0,00 pg/ml ab. Nach vollständiger Restimulation stieg der TNF- α -Gehalt auf Peak-Konzentrationen von 235,91 pg/ml (Tag 8, nach erster Restimulation) und 382,96 pg/ml ($>$ *ULOD*; Tag 15, nach zweiter Restimulation) an. Eine zellbasierte Restimulation ergab maximale TNF- α -Sekretionen von 71,14 pg/ml an Tag 8 und 157,68 pg/ml an Tag 15.

Lediglich bei IL-2, IFN- γ und TNF- α lagen die maximalen Konzentrationen nach zweiter Restimulation (Tag 15) über denen, die nach erster Restimulation sezerniert wurden (Tag 8).

Die Zytokinsekretionen in den Monokulturen der KLH-gereiften moDCs lagen zu jedem Analysezeitpunkt konstant in einem Konzentrationsbereich von < 11,63 pg/ml, wiesen nahezu keine Schwankungen über die Zeit auf und wurden durch die jeweiligen Restimulationen kaum beeinflusst (maximal erreichte Differenz [Tag 14 vs. Tag 15; TNF- α]: 10,83 pg/ml).

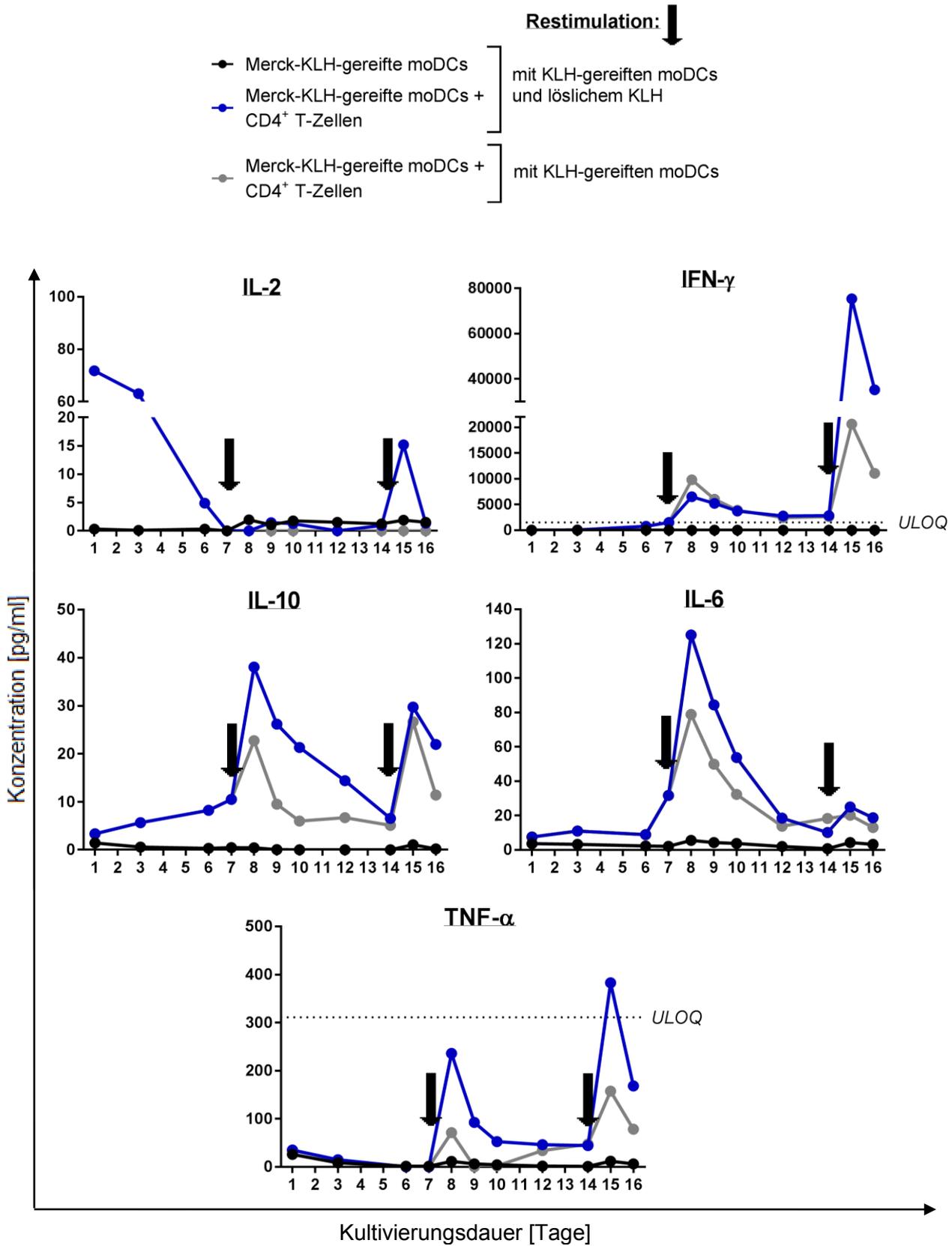


Abbildung 32: Sekretion der Zytokine IL-2, IFN-γ, IL-10, IL-6 und TNF-α im zeitlichen Verlauf einer erweiterten Kokultur mit Merck-KLH [100 µg/ml] über 16 Tage mit Restimulationen an Tag 7 und 14. Die Daten zeigen die induzierten Konzentrationen (pg/ml) der Zytokine IL-2, IFN-γ, IL-10, IL-6 und TNF-α im Verlauf einer Kokultur von Merck-KLH-gereiften moDCs mit autologen CD4⁺ T_H-Zellen. Die Restimulation (schwarze Pfeile) mit KLH-gereiften moDCs erfolgte sowohl mit (blau; vollständige Restimulation) als auch ohne (grau; zellbasierte Restimulation) Zugabe des löslichen Antigens (KLH). Monokulturen der KLH-gereiften moDCs dienten als Kontrolle (schwarz).

Hintergrundwerte der stimulierten Monokulturen von CD4⁺ T_H-Zellen wurden subtrahiert. Daraus resultierende negative Werte wurden gleich Null gesetzt. Die täglichen Zellkulturüberstände wurden mittels MSD analysiert. Die technischen Triplikate pro Ansatz wurden vor MSD-Analyse vereinigt. *ULOQ: Upper Limit of Quantification.*

Die generierten Merck-KLH-gereiften moDCs wurden vor ihrem Einsatz in der Kokultur zudem auf die Expression ihrer Oberflächenmarker untersucht (Daten nicht gezeigt). Diese entsprachen den Ergebnissen, welche bereits in Kapitel 3.1.4.1 generiert wurden und sind aus diesem Grund nicht erneut aufgeführt.

Im Rahmen eines weiteren Experimentes wurden zwei erweiterte Kokulturen, bestehend aus Merck-KLH-gereiften moDCs und CD4⁺ T-Zellen, angesetzt und an Tag 7 mit KLH-gereiften moDCs restimuliert. Eine unterschiedliche Stimulation erfolgte an Tag 14 mit KLH-gereiften moDCs (KLH / KLH / KLH) bzw. OVA-gereiften moDCs (KLH / KLH / OVA). Die Stimulation mit OVA-gereiften moDCs stellte in diesem Experiment eine Stimulation mit einem, für die Induktion einer Sekundärantwort, irrelevanten Antigen dar.

Am Ende der erweiterten Kokulturen (Tag 16) wurde eine durchflusszytometrische Analyse der Viabilität aller Zellen mittels PI durchgeführt und der Anteil PI-positiver T_H-Zellen bestimmt (Abb. 33). Da der Anteil PI-positiver T_H-Zellen in den einzelnen Kokulturen vergleichbar war, konnte hieraus letztendlich auf den Anteil PI-positiver moDCs geschlossen werden.

Die Monokulturen der KLH-gereiften moDCs wiesen nach 16-tägiger Kokultivierung (mit Restimulationen an Tag 7 und 14) 5,0 % PI-positive Zellen auf. Die Kokultur (Abb. 33; KLH / KLH / KLH) hingegen enthielt 22,3 % PI-positive Zellen. Die T-Zell-Population machte in dieser Kokultur einen prozentualen Anteil von 13,9 % der Gesamtanzahl an Zellen aus, wovon wiederum 1,5 % PI-positiv waren. Die Kokultur, bei der die letzte Stimulation mit OVA-gereiften moDCs erfolgte, wies 19,0 % PI-positive Zellen auf. Dieser Anteil lag somit 3,3 % unter dem der Kokultur mit reinen KLH-(Re-)Stimulationen. Der prozentuale Anteil an T-Zellen in der Gesamtpopulation und auch der Anteil PI-positiver T-Zellen waren mit dem in der reinen KLH-Kokultur vergleichbar (14,3 % T-Zellen, davon 1,5 % PI-positiv).

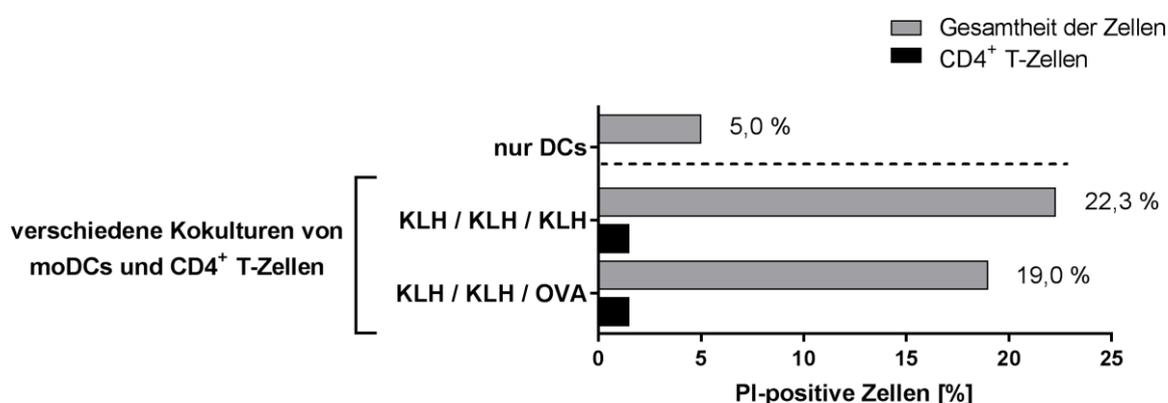


Abbildung 33: Durchflusszytometrische Viabilitätsanalyse mittels PI am Ende einer erweiterten Kokultur (Tag 16) mit Merck-KLH [100 µg/ml]. Am Ende der Kokultur von Merck-KLH-gereiften moDCs mit autologen

CD4⁺ T_H-Zellen wurde die Gesamtheit aller Zellen geerntet, ihre Viabilität mittels PI-Analyse untersucht und der Anteil PI-positiver T_H-Zellen bestimmt. Beide Kokulturen wurden mit KLH-gereiften moDCs und CD4⁺ T-Zellen gestartet und an Tag 7 mit KLH-gereiften moDCs restimuliert. Eine unterschiedliche Stimulation erfolgte an Tag 14 (KLH-gereifte moDCs [KLH / KLH / KLH] bzw. OVA-gereifte moDCs [KLH / KLH / OVA]). Monokulturen der KLH-gereiften moDCs dienten als Kontrolle. Die Daten zeigen den prozentualen Anteil PI-positiver Zellen. Die technischen Triplikate wurden vor durchflusszytometrischer Analyse vereinigt.

Für die letzte Restimulation wurde das pyrogenhaltige Sigma-OVA verwendet. Die induzierten Zytokinsekretionen konnten somit nicht in die Auswertung mit eingehen, da auch hier nicht zwischen einer antigenen und einer inflammatorischen Reaktion differenziert werden konnte.

In den erweiterten Kokulturen zeigte sich also, dass die Konzentrationen der sezernierten Zytokine bereits vor einer ersten Restimulation im zeitlichen Verlauf von Tag 1 bis Tag 7 anstiegen und sich deutlich von den Zytokinkonzentrationen einer Monokultur KLH-gereifter moDCs unterschieden. IL-6 und IL-10 erreichten ihre Peak-Konzentrationen nach erster Restimulation an Tag 8. Bei IL-2, IFN- γ und TNF hingegen überstiegen die Zytokinkonzentrationen nach zweiter Restimulation an Tag 15 die jeweiligen Sekretionen an Tag 8. Im Vergleich zu einer zellbasierten Restimulation resultierte eine vollständige Restimulation in einer gesteigerten Zytokinfreisetzung.

Zudem zeigte sich, dass Kokulturen von KLH-gereiften moDCs und CD4⁺ T-Zellen nach 16-tägiger Kultivierungsdauer, mit Restimulationen an Tag 7 und 14, einen weitaus höheren Anteil PI-positiver Zellen enthielten als Monokulturen spezifisch-gereifter moDCs. In den Kokulturen entfiel der größte Anteil PI-positiver Zellen auf die moDCs.

3.1.5 Einfluss therapeutischer monoklonaler Antikörper auf die Zellen einer Kokultur

3.1.5.1 Analyse der Primärantwort

Über die Untersuchung von hoch immunogenen Modell-Antigenen wie KLH und OVA hinaus, wurden im Rahmen dieses *in vitro* Testsystems (therapeutische) mAks auf ihre Eigenschaft zur möglichen Zell-Aktivierung analysiert.

Zunächst galt es einen mAk als Positivkontrolle zu etablieren. Hierzu wurde OKT3 verwendet, der als muriner Antikörper *per se* ein Xenogen für humane immunkompetente Zellen darstellt. Ziel war es, neben einer Analyse der Immunogenität, die anfängliche Aktivierung von T-Lymphozyten über CD3 zu detektieren. Für jede OKT3-Konzentration wurden drei Kultivierungsansätze untersucht: Kokulturen von CD4⁺ T-Zellen und OKT3-gereifte moDCs sowohl mit als auch ohne die Zugabe von löslichem OKT3 sowie eine Monokultur aus CD4⁺ T-Zellen, die zu Beginn der Kultur (Tag 0) mit löslichem OKT3 stimuliert wurden.

Eine Reifung der moDCs für 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen OKT3 (0,02 – 12,5 µg/ml) hatte kaum aktivierende Effekte auf die Expression der analysierten Oberflächenmarker (Abb. 34A). Zumeist lagen die relativen Expressionen unterhalb den Expressionen der Negativkontrolle. Auf die Oberflächenmarker HLA-DR und CD209 hatte die Reifung keinen Einfluss (Daten nicht gezeigt).

Die Analyse der Proliferation nach sechstägiger Kokultivierung der OKT3-gereiften moDCs mit autologen CD4⁺ T-Zellen und zusätzlichem löslichen Antigenstimulus (■) ergab eine deutliche Induktion. Die relativen Proliferationen nahmen im Median mit steigender OKT3-Konzentration bis auf das maximal 3,33-fache (12,5 µg/ml) der Negativkontrolle (Kokulturen von T_H-Zellen mit unreifen moDCs) zu (Abb. 34B). Die medianen Proliferationen in den Kokulturen ohne zusätzlichen löslichen OKT3-Stimulus zum Start der Kokultur (□) zeigten keine konzentrationsabhängigen Effekte. Auffällig war, dass in beiden Kulturen über die gesamte Konzentrationsspanne hinweg der gleiche Donor die höchste Sensitivität aufwies (anonymisierte Darstellung der Werte in Abb. 34). Die Reaktionen dieses Donors unterschieden sich in den Kultivierungsansätzen mit und ohne löslichem Stimulus darin, dass bei zusätzlichem löslichem Stimulus (■) die Proliferation mit steigender OKT3-Konzentration zunahm, während eine Kokultur ohne diesen Stimulus (□) zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme führte.

Auch im Fall der CD25-Expression zeigte dieser Donor die höchste Sensitivität gegenüber OKT3 (Abb. 34C). In der Kokultur mit zusätzlichem löslichem Antigenstimulus (■) wurde mit zunehmender OKT3-Konzentration eine Abnahme der CD25-Expression vom 22,67-fachen auf das 12,0-fache der Negativkontrolle detektiert. In der Kokultur ohne lösliches OKT3 (□) zeigte dieser Donor eine konzentrationsabhängige Zunahme der Expression (vom 0,75-fachen auf das

21,5-fache der Negativkontrolle). Die medianen CD25-Expressionen aller Donoren hingegen wiesen keine Konzentrationsabhängigkeit auf. Hier lagen die CD25-Expressionen der T-Zellen aus den Kokulturen mit zusätzlichem löslichen Stimulus über alle OKT3-Konzentrationen hinweg über denen der T-Lymphozyten aus den Kokulturen ohne diesen Stimulus.

Sowohl die Proliferationen als auch die CD25-Expressionen aller T-Zellen der stimulierten Monokulturen lagen über die gesamte Konzentrationsspanne von OKT3 hinweg unterhalb den Werten der Negativkontrolle.

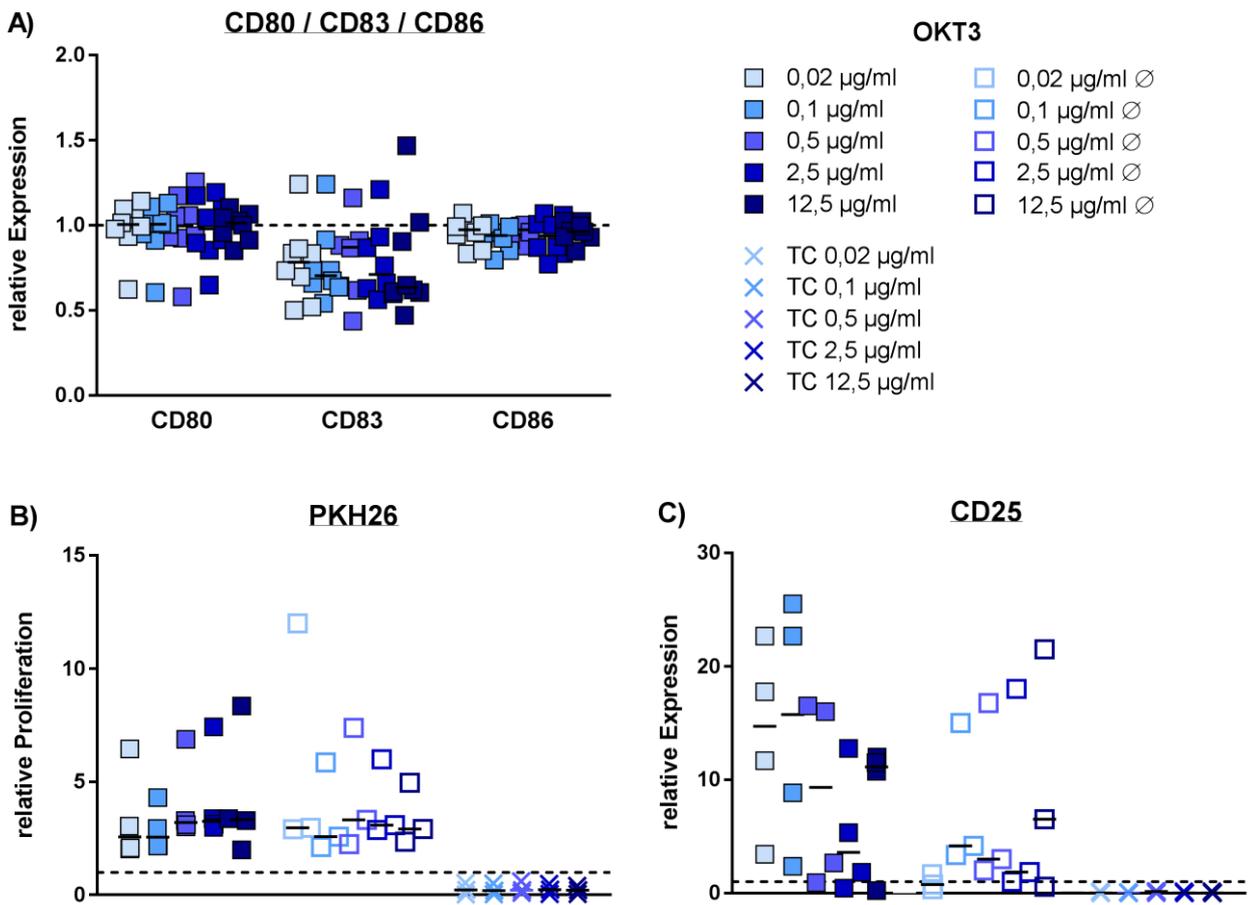


Abbildung 34: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarkerexpression von moDCs nach spezifischer Reifung mit OKT3 sowie des Aktivierungsprofils von TH-Zellen nach Kokultivierung mit OKT3-gereiften moDCs. A) Oberflächenmarkerprofil von moDCs. B, C) TH-Zell-Aktivierung. DCs wurden für 48 Stunden mit OKT3 [0,02 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,5 µg/ml; 2,5 µg/ml; 12,5 µg/ml] gereift und anschließend auf ihre Oberflächenmarkerexpression untersucht. A) CD80, CD83, CD86. TH-Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26 markiert, für sechs Tage mit OKT3-gereiften moDCs kokultiviert und auf ihre Aktivierung analysiert. B) Proliferation (PKH26). C) CD25-Expression. ■: zusätzlicher OKT3-Stimulus zum Start der Kokultur. □: ohne zusätzlichen OKT3-Stimulus zum Start der Kokultur. ×: Monokultur von TH-Zellen + OKT3 (löslich). Die Daten zeigen die relative Expression der jeweiligen Oberflächenmarker (A, C) bzw. die relative Proliferation (B) pro Behandlungsgruppe im Vergleich zur Negativkontrolle (mit Zellkulturmedium behandelte moDCs bzw. Kokulturen von TH-Zellen mit unreifen moDCs; gestrichelte Linie). Die relative Expression bzw. Proliferation (Verhältnis Behandlung vs. Negativkontrolle) wurde berechnet, indem pro Probe der Quotient zur Negativkontrolle gebildet wurde. Dargestellt sind die Einzelwerte der Donoren mit Median pro Behandlungsgruppe (Querstrich; A: n=8; B: n=3-4; C: n=3-4).

Für die folgenden Experimente erfolgte die Stimulation der T-Lymphozyten mit spezifisch gereiften moDCs und zusätzlich löslichem Antigen.

Eine Reifung der moDCs für 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen MabThera (0,1 – 150 µg/ml) hatte auch hier nur wenig aktivierende Effekte auf die Expression der analysierten Oberflächenmarker (Abb. 35A). Lediglich CD80 wurde bei einem der Donoren über die gesamte Konzentrationsspanne hinweg induziert. Dieser Donor zeigte im weiteren Verlauf bei Analyse der Proliferation und CD25-Expression keine erhöhte Sensitivität. Auf die Oberflächenmarker HLA-DR und CD209 hatte die Reifung mit MabThera keinen Einfluss (Daten nicht gezeigt).

Die Analyse der Proliferation nach sechstägiger Kokultivierung der MabThera-gereiften moDCs mit autologen CD4⁺ T-Zellen ergab eine konzentrationsabhängige Abnahme der medianen T-Zell-Proliferation vom 1,2-fachen auf das 0,97-fache der Negativkontrolle (Abb. 35B). Einer der Donoren zeigte ab einer MabThera-Konzentration von 10 µg/ml bis 150 µg/ml eine maximale Induktion der Proliferation.

Auch bei der Analyse der CD25-Expression zeigte dieser Donor die höchste Sensitivität und somit eine maximale Induktion (Abb. 35C). Die medianen Expressionen hingegen ergaben keine konzentrationsabhängigen Effekte und lagen im Bereich einer Induktion vom 1,09- (1 µg/ml) bis zum 2,2-fachen (150 µg/ml) der Negativkontrolle. Die höchsten medianen Induktionen wurden bei den zwei höchsten MabThera-Konzentrationen detektiert (1,6-fach bei 100 µg/ml; 2,2-fach bei 150 µg/ml).

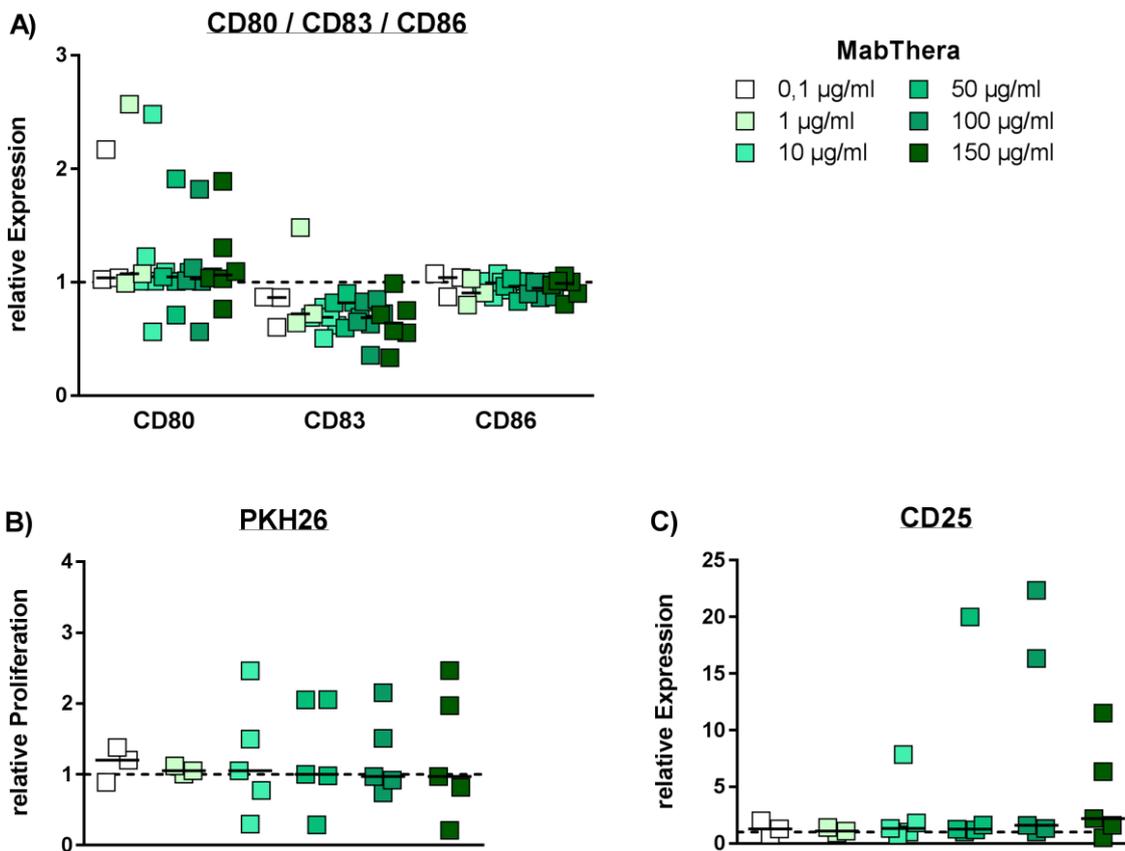


Abbildung 35: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarkerexpression von moDCs nach spezifischer Reifung mit MabThera sowie des Aktivierungsprofils von T_H -Zellen nach Kokultivierung mit MabThera-gereiften moDCs. A) Oberflächenmarkerprofil von moDCs. B, C) T_H -Zell-Aktivierung. DCs wurden für 48 Stunden mit MabThera [0,1 µg/ml; 1 µg/ml; 10 µg/ml; 50 µg/ml; 100 µg/ml; 150 µg/ml] gereift und anschließend auf ihre Oberflächenmarkerexpression untersucht. A) CD80, CD83, CD86. T_H -Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26 markiert, für sechs Tage mit MabThera-gereiften moDCs kokultiviert und auf ihre Aktivierung analysiert. B) Proliferation (PKH26). C) CD25-Expression. Die Daten zeigen die relative Expression der jeweiligen Oberflächenmarker (A, C) bzw. die relative Proliferation (B) pro Behandlungsgruppe im Vergleich zur Negativkontrolle (mit Zellkulturmedium behandelte moDCs bzw. Kokulturen von T_H -Zellen mit unreifen moDCs; gestrichelte Linie). Die relative Expression bzw. Proliferation (Verhältnis Behandlung vs. Negativkontrolle) wurde berechnet, indem pro Probe der Quotient zur Negativkontrolle gebildet wurde. Dargestellt sind die Einzelwerte der Donoren mit Median pro Behandlungsgruppe (Querstrich; A, B: n=3-6; C: n=3-5).

3.1.5.2 Einfluss einer Aggregatbildung auf die Primärreaktion

In einem finalen Versuchsdurchlauf wurde sowohl die moDC- als auch die T-Zell-Aktivierung sieben verschiedener Donoren nach *in vitro* Stimulation mit den therapeutischen mAk MabThera, Arzerra, Remicade und Humira untersucht. Hierbei stand ein Vergleich der nativen mit der aggregierten Form der Antikörper im Vordergrund. Zur Generierung der Aggregate (Kap. 2.2.8) wurden die mAk zuvor thermalem Stress ausgesetzt. Die Charakterisierung der Aggregate erfolgte mit Hilfe der DLS. OKT3 wurde als Positivkontrolle in nativer Form mitgeführt.

Um einen Vergleich zu gewährleisten, wurde im Rahmen der DLS-Messungen sowohl die native als auch die aggregierte Form des jeweiligen mAKs auf Aggregate analysiert (Tab. 10).

Tabelle 10: Ergebnisse der DLS-Analyse der nativen und aggregierten monoklonalen Antikörper. Dargestellt sind die Werte des Hauptpeaks des gesamten Streulichts sowie der prozentuale Anteil hochmolekularer Bestandteile der jeweiligen Probe (n=2). Masse [%]: Anteil der Masse des Peaks im Vergleich zur gesamten Probe; Rh: durchschnittlicher hydrodynamischer Radius der Moleküle im Peak.

	Masse [%]	Rh	Poly-dispersität [%]	Hochmolekulare Bestandteile [%]
MabThera				
<i>nativ</i>	99,3 (± 0,3)	5,4 nm (± 0,1)	< 15,0	≤ 0,9
<i>aggregiert</i>	96,8 (± 0,4)	4,9 nm (± 0,4)	34,7 (± 6,7)	< 3,6
Arzerra				
<i>nativ*</i>	100,0	4,9 nm	< 15,0	0,0
<i>aggregiert</i>	96,9 (± 1,2)	5,4 nm (± 0,1)	< 15,0	≤ 3,4
Remicade				
<i>nativ</i>	92,9 (± 2,0)	8,7 nm (± 0,0)	< 15,0	≤ 8,5
<i>aggregiert</i>	92,0 (± 9,4)	49,0 µm (± 4,2)	36,8 (± 33,7)	92,6 (± 9,6)
Humira				
<i>nativ</i>	100,0 (± 0,0)	5,3 nm (± 0,1)	< 15,0	0,0
<i>aggregiert</i>	100,0 (± 0,0)	4,8 nm (± 0,7)	< 15,0	0,0

* aufgrund einer Verunreinigung bei der zweiten Messung der technischen Duplikate wurde hier nur n=1 angegeben.

Bei MabThera zeigten die nativen Proben einen monodispersen Hauptpeak (99,3 %) bei einem mittleren hydrodynamischen Radius (Rh) von 5,4 nm und geringen hochmolekularen Bestandteilen (≤ 0,9 %). Die aggregierten Proben wiesen einen Peak (96,8 %) bei einem mittleren Rh von 4,9 nm auf, wobei dieser eine erhöhte mittlere Polydispersität zeigte (34,7 %). Der Anteil hochmolekularer Bestandteile erhöhte sich auf < 3,6 %.

Arzerra zeigte in nativer Form einen monodispersen Peak bei einem Rh von 4,9 nm. Bei der zweiten Messung (Duplikat) wurde ein weiterer Peak bei 77,1 µm sichtbar. Da es sich hier höchstwahrscheinlich um eine Verunreinigung der Probe durch Staubpartikel handelte, wurden die Daten dieser zweiten Messung nicht mit in Tab. 10 einbezogen. Die aggregierten Proben wiesen ebenfalls einen monodispersen Peak (96,9 %) bei einem Rh von durchschnittlich 5,4 nm auf. Es wurden geringe Anteile hochmolekularer Bestandteile gemessen (≤ 3,4 %).

Bei Remicade zeigten die nativen Proben einen monodispersen Hauptpeak (92,9 %) bei einem mittleren Rh von 8,7 nm und $\leq 8,5 \%$ hochmolekulare Bestandteile bei etwa 8,3 μm (Abb. 36A). Die aggregierten Proben ließen mehrere zum Teil hochpolydisperse Peaks im Bereich eines Rh von 4,7 nm – 52,0 μm erkennen (Abb. 36B), wobei der größte Anteil der Probe (Hauptpeak des gesamten Streulichtes: 92 %) bei einem Rh von durchschnittlich 49 μm lag.

Humira zeigte in nativer Form einen monodispersen Peak (100 %) bei einem mittleren Rh von 5,3 nm. Auch die aggregierten Proben wiesen einen monodispersen Peak (100 %) bei einem Rh von durchschnittlich 4,8 nm auf. Bei dieser Probe konnte keine Veränderung in der Dispersität zwischen nativer und aggregierter Form detektiert werden.

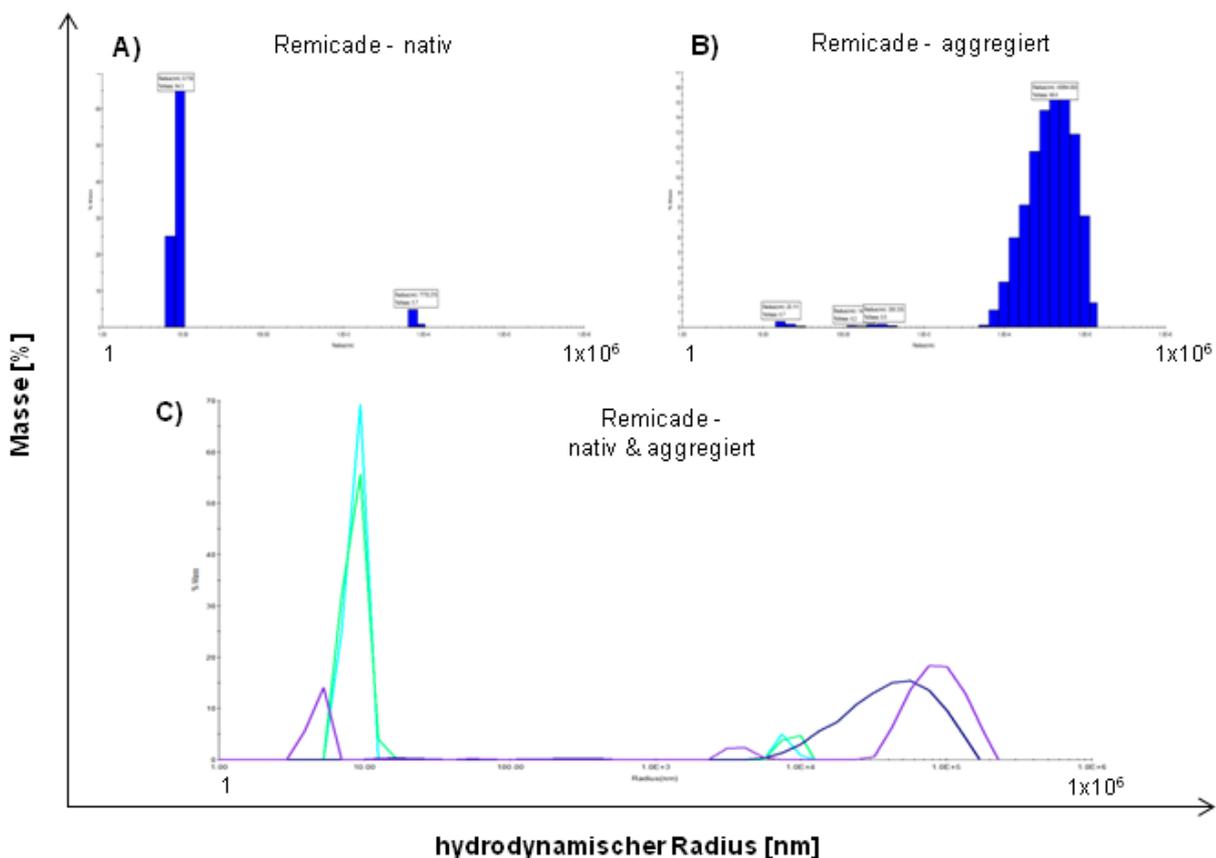


Abbildung 36: DLS-Analyse am Beispiel von Remicade. A) Analyse der nativen Form. B) Analyse der aggregierten Form. C) Überlagerung der Histogramme der Doppelmessungen der nativen (grüne Linien) und der aggregierten Form (lila-blaue Linien). Die Daten zeigen die prozentuale Masse (y-Achse) aufgetragen gegen den hydrodynamischen Radius (x-Achse).

Um für die Analyse der Primärreaktion sicherzustellen, dass die eingesetzten autologen T-Lymphozyten nicht bereits *per se* einen erhöhten Aktivierungsstatus aufweisen, wurden Monokulturen der T-Lymphozyten mitgeführt und am Ende der Kultivierungsdauer (Tag 6) analysiert. Es zeigte sich, dass sowohl die Proliferation als auch die CD25-Expression dieser

Zellen bei allen Donoren deutlich unter den jeweiligen Werten der Kontroll-Kokulturen (Kokulturen von T_H-Zellen mit unreifen moDCs) lagen (Daten nicht gezeigt).

Eine Reifung der moDCs mit OKT3 hatte auch im Rahmen dieser Versuche keinen Einfluss auf die Expression der analysierten Oberflächenmarker CD80, CD83, CD86, CD40, HLA-DR (high) und CD209. Die Expressionen lagen im Bereich der Negativkontrolle (mit Zellkulturmedium behandelte moDCs; Daten nicht gezeigt). Eine Kokultivierung von OKT3-gereiften moDCs mit autologen, PKH26-markierten T-Lymphozyten resultierte an Tag 6 der Kokultur bei sechs von sieben Donoren in einer konzentrationsunabhängigen Induktion der T-Zell-Proliferation (Abb. 37A). Diese reichte, in Abhängigkeit vom analysierten Donor, vom 1,54-fachen (Donor # 7; 0,5 µg/ml) bis zu einer maximalen Induktion des 12,21-fachen (Donor # 2; 2,5 µg/ml) der Negativkontrolle. Die CD25-Expression wurde bei allen Donoren induziert und reichte vom 3,10-fachen (Donor # 1; 0,1 µg/ml) bis zum 7,19-fachen (Donor # 6; 2,5 µg/ml) der Negativkontrolle (Abb. 37B). Innerhalb der einzelnen Endpunkte zeigten gleiche Donoren über die gesamte Konzentrationsspanne (0,1 – 12,5 µg/ml) hinweg vergleichbare Induktionslevel. Jedoch korrelierte das Induktionslevel einzelner Donoren bei der Proliferation nicht mit dem Induktionslevel bei der CD25-Expression. Eine Gruppierung der Reaktionen einzelner Donoren nach Induktionsstärken resultierte folglich in unterschiedlichen Reihenfolgen in Abhängigkeit vom analysierten Endpunkt.

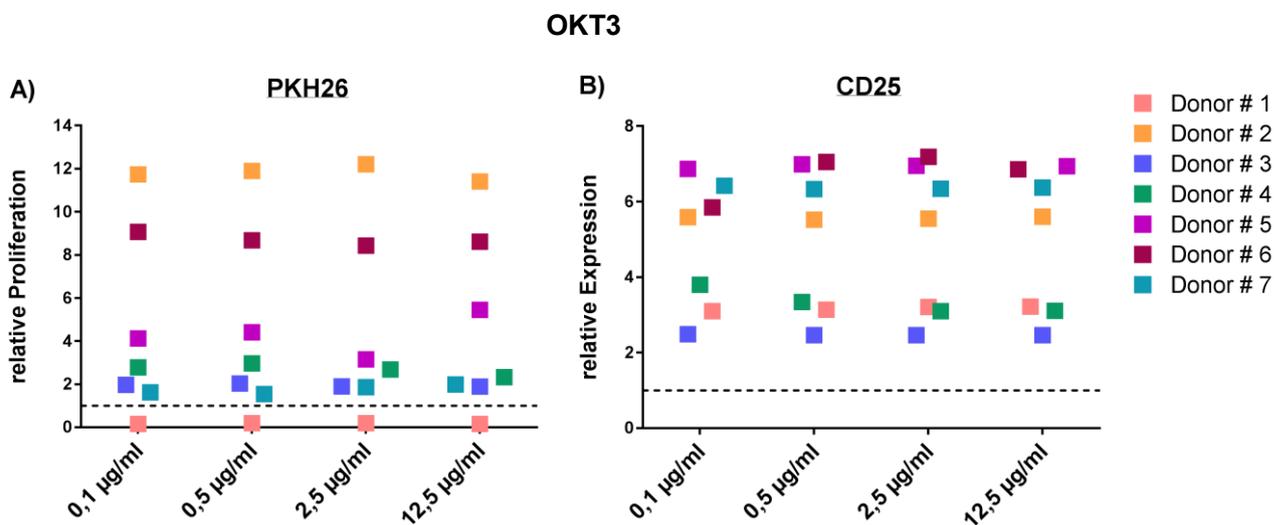


Abbildung 37: Durchflusszytometrische Analyse des Aktivierungsprofils von T_H-Zellen nach sechstägiger Kokultivierung mit OKT3-gereiften moDCs. A) PKH26-positive Zellen (Proliferation). B) CD25-Expression.

Die therapeutischen Antikörper MabThera, Arzerra und Humira hatten bei keinem der Donoren, weder in nativer noch in aggregierter Form, Einfluss auf die Expression der verschiedenen Oberflächenmarker der moDCs und den Aktivierungsstatus der T-Zellen nach sechstägiger Kokultivierung (Daten nicht gezeigt).

Beim nativen Remicade konnte ebenfalls kein Einfluss auf die Oberflächenmarkerexpression der spezifisch gereiften moDCs nachgewiesen werden (CD86: Abb. 38A; Daten der übrigen Marker nicht gezeigt).

Nach sechstägiger Kokultivierung dieser Remicade-gereiften moDCs mit autologen T-Zellen wurde bei niedrigster Konzentration (0,1 µg/ml) der nativen Form bei vier Donoren eine induzierte T-Zell-Proliferation detektiert (# 2: 2,07-fache; # 3: 1,10-fache; # 5: 1,36-fache; # 7: 2,59-fache der Negativkontrolle; Abb. 38B). Mit Ausnahme von Donor # 5, der auch bei einer Konzentration von 1 µg/ml eine Induktion der Proliferation um das 1,22-fache der Negativkontrolle aufwies, war eine erhöhte T-Zell-Proliferation im Vergleich zur Negativkontrolle in den übrigen Konzentrationen nicht nachzuweisen. Die induzierte T-Zell-Aktivierung bei niedrigster Remicade-Konzentration (0,1 µg/ml) spiegelte sich bei drei dieser Donoren zudem in der CD25-Expression wider (# 2: 1,19-fache; # 5: 1,24-fache; # 7: 5,66-fache; Abb. 38C). Auch hier wurde in allen höheren Konzentrationen keine gesteigerte CD25-Expression im Vergleich zur Negativkontrolle detektiert.

In aggregierter Form induzierte Remicade in maximaler Konzentration (100 µg/ml) bei sechs der sieben Donoren (Ausnahme: Donor # 7) nach spezifischer Reifung der moDCs eine erhöhte CD86-Expression im Vergleich zur nativen Form (Abb. 38A). Die Induktionen reichten vom 1,23-fachen (Donor # 1) bis zu einem 4,0-fachen (Donor # 4) des nativen Remicades. Bei vier der Donoren lag die Expression über der Negativkontrolle (# 5: 1,16-fache; # 6: 1,30-fache; # 3: 1,64-fache; # 4: 2,02-fache der Negativkontrolle). Alle weiteren analysierten Oberflächenmarker wurden nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Bei niedrigeren Konzentrationen blieb eine Induktion ebenfalls aus. Die Werte befanden sich im Bereich der Negativkontrolle oder darunter. Eine Kokultivierung von T-Zellen mit moDCs, die zuvor mit der aggregierten Form von Remicade gereift wurden, resultierte bei allen sieben Donoren in einer Induktion der T-Zell-Proliferation bei maximaler Remicade-Konzentration (100 µg/ml) im Vergleich zu den korrespondierenden Ansätze mit der nativen Form (Abb. 38B). Die T-Zell-Proliferation wurde vom 1,09-fachen (Donor # 6) bis zu einer maximalen Induktion um das 2,17-fache (Donor # 5) erhöht. Bei sechs der sieben Donoren lag diese erhöhte Proliferation über der Negativkontrolle (# 6 und # 4: 1,16-fache; # 3: 1,33-fache; # 7: 1,41-fache; # 2: 1,48-fache; # 5: 1,78-fache der Negativkontrolle). Mit Ausnahme von Donor # 2 (10 µg/ml; Induktion: 1,14-fache der Negativkontrolle) hatte keine der getesteten Remicade-Konzentrationen unter 100 µg/ml Einfluss auf die Zellproliferation. Die Werte lagen im Bereich der Negativkontrolle oder niedriger. Auch bei der Analyse des T-Zell-Aktivierungsmarkers CD25 zeigten sechs der sieben Donoren eine erhöhte Expression bei maximaler Remicade-Konzentration im Vergleich zu den korrespondierenden Ansätzen mit der nativen Form (Abb. 38C). Die Expression wurde vom 1,07-fachen (Donor # 6) bis zu einer maximalen Induktion um das 2,61-fache (Donor # 7) hoch reguliert. Somit zeigten sich bei Donor # 6 sowohl bei der T-Zell-Proliferation als auch bei der

CD25-Expression die geringsten Induktionen. Bei fünf der sieben Donoren lag die CD25-Expression über der Negativkontrolle (# 6: 1,09-fache; # 4: 1,10-fache; # 5: 1,23-fache; # 3: 1,33-fache; # 7: 2,64-fache der Negativkontrolle). Bei niedrigeren Remicade-Konzentrationen (0,1-10 µg/ml) konnte kein Einfluss auf die CD25-Expression detektiert werden.

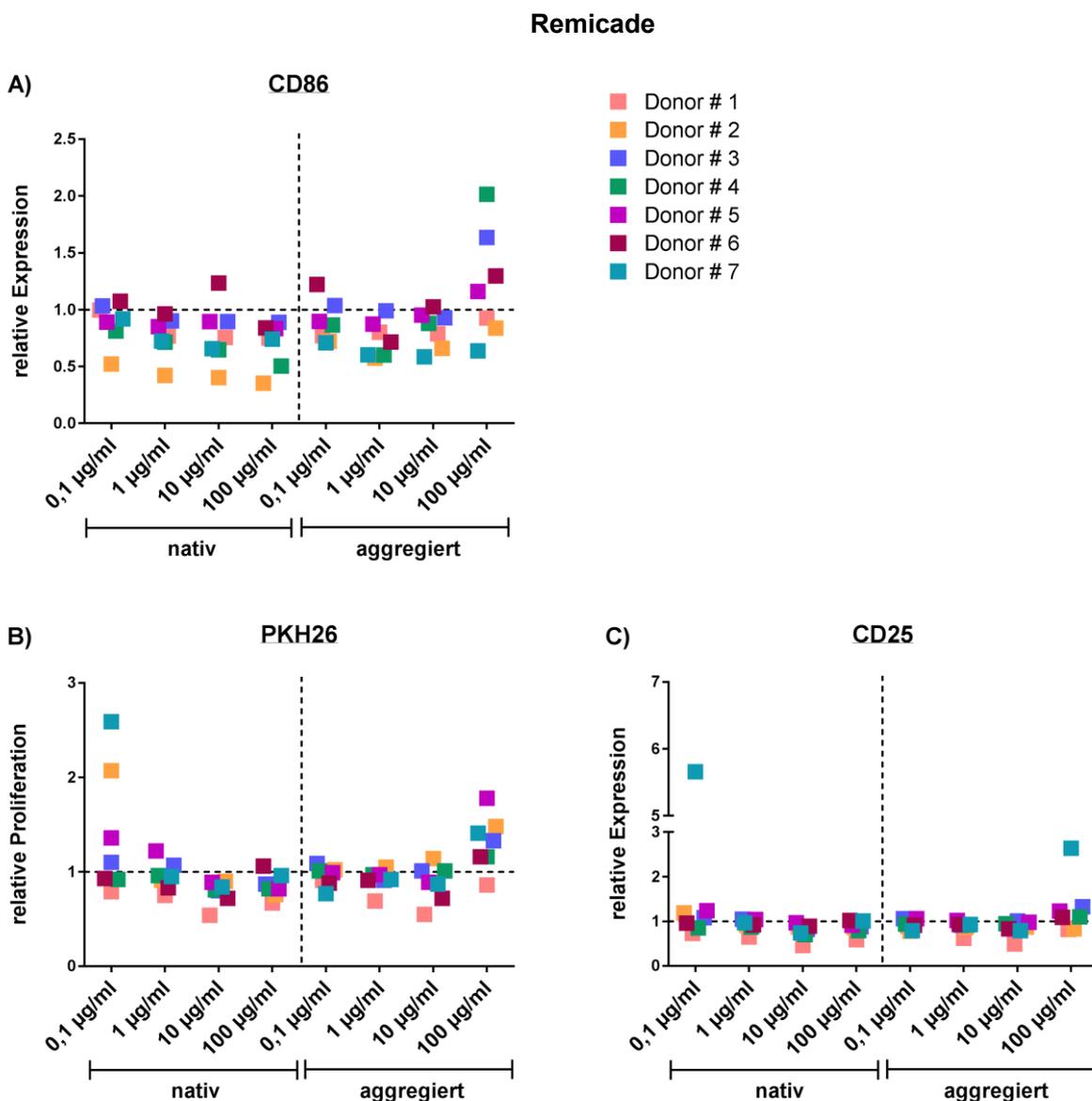


Abbildung 38: Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses von nativem und aggregiertem Remicade auf das Aktivierungsprofil von moDCs und T_H-Zellen. A) CD86-Expression von moDCs nach spezifischer Reifung für 48 Stunden. B) PKH26-positive Zellen (Proliferation) und C) CD25-Expression von T-Zellen nach sechstägiger Kokultivierung mit Remicade-gereiften moDCs.

3.2 Gemischte Lymphozytenreaktion

Um in einem *in vitro* Modell eine Immunantwort in Form einer maximalen T-Zell-Reaktion zu induzieren, wird ein sehr starker Stimulus benötigt. Hier stellte sich die gemischte Lymphozytenreaktion (*mixed lymphocyte reaction*; MLR), eine Kokultivierung von *Responder*-T-Lymphozyten mit allogenen PBMCs, als geeignetes System heraus. Der aktivierende Stimulus war das fremde Histokompatibilitätsantigen (HLA) auf der Oberfläche der allogenen PBMCs. Zur Induktion einer primären Immunreaktion wurden diese PBMCs als Stimulator-Zellen im Rahmen der klassischen MLR über eine Dauer von sechs Tagen mit T-Lymphozyten kultiviert. Bei der „erweiterten MLR“ wurden die Zellen über eine verlängerte Dauer von 12 Tagen kokultiviert. An Tag 6 erfolgte ein wiederholter Kontakt mit dem antigenen Stimulus durch eine Restimulation der T-Lymphozyten mit weiteren allogenen PBMCs, um eine sekundäre Immunantwort auszulösen.

3.2.1 Wirkung von Mitomycin C auf die Zellproliferation von PBMCs

Um ausschließlich die Reaktionen der T-Zell-Population zu detektieren, wurden die allogene Stimulator-PBMCs zuvor mit MitC behandelt. Der Gebrauch von MitC ist in der experimentellen Immunologie eine gängige Methode zur Inhibierung der DNA-Replikation von Stimulator-Zellpopulationen (Szybalski und Iyer, 1964; Tomasz, 1994). Es wurde zunächst eine optimale MitC-Konzentration ermittelt, um allogene PBMCs als Stimulator-Zellpopulation für die MLR zu etablieren.

Hierzu wurden PBMCs vor Kultivierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26 inkubiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen MitC behandelt. Nach viertägiger Kultivierung (+/- ConA) erfolgte die Analyse der Proliferation (Abb. 39).

Die PKH26-Analyse zeigte, dass die Proliferation von MitC-unbehandelten PBMCs bei Stimulation mit ConA konzentrationsabhängig vom 7,47-fachen (2 µg/ml ConA) auf das 13,42-fache (4 µg/ml ConA) der Negativkontrolle (unbehandelte Zellen) anstieg. Eine Vorbehandlung der Zellen mit MitC wirkte dem stimulierenden Effekt von ConA entgegen. Bereits eine MitC-Konzentration von 10 µg/ml reduzierte die Proliferation nach Stimulation mit 2 µg/ml ConA vom 7,47-fachen (ohne MitC) auf das 1,47-fache und nach Stimulation mit 4 µg/ml ConA vom 13,42-fachen (ohne MitC) auf ein 3,32-faches der Negativkontrolle. Mit steigender MitC-Konzentration nahm die Proliferation konzentrationsabhängig ab. Bei einer Konzentration von 75 µg/ml MitC wurde eine Proliferation erreicht, welche sich sowohl bei einer Stimulation mit 2 µg/ml als auch mit 4 µg/ml ConA im Bereich der Negativkontrolle befand (2 µg/ml: 1,11-fache Induktion; 4 µg/ml: 1,16-fache Induktion). Eine Erhöhung der MitC-Konzentration auf 100 µg/ml führte zu

einer reduzierten Proliferation, die um das 0,11-fache (2 µg/ml ConA) bzw. 0,05-fache (4 µg/ml ConA) niedriger war als die Zellproliferation der Negativkontrolle.

Die Proliferation von ConA-unbehandelten Zellen stieg durch eine Vorbehandlung der Zellen mit 10 µg/ml MitC zunächst auf ein 1,53-faches der Negativkontrolle an und reduzierte sich mit steigender MitC-Konzentration auf das 0,95- (75 µg/ml MitC) bzw. 0,89-fache (100 µg/ml MitC).

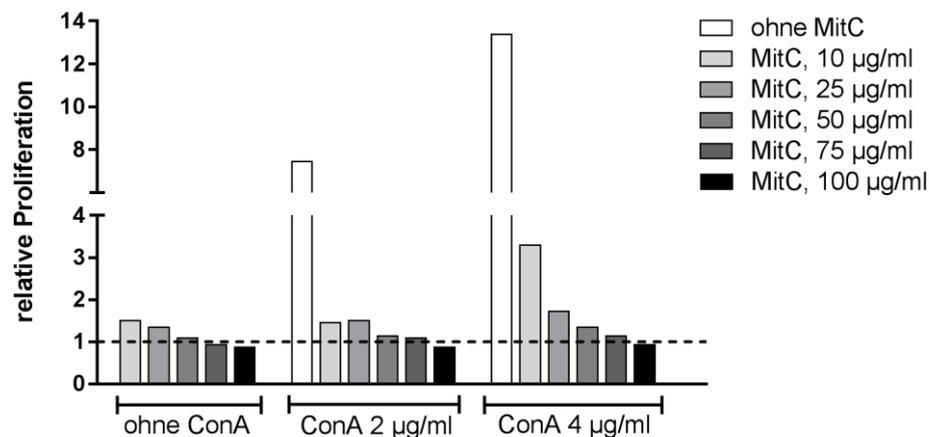


Abbildung 39: Titration der optimalen MitC-Konzentration zur Inhibierung der Proliferation von PBMCs. Die Zellen (2×10^5 / 200 µl) wurden zum Start der Kultur mit unterschiedlichen Konzentrationen MitC (+/- ConA) behandelt. Die Messung der Proliferation erfolgte nach einer Kultivierungsdauer von vier Tagen (96-Well-Flachbodenplatten) mittels PKH26-Test. Die Daten zeigen die relative Proliferation im Vergleich zur Negativkontrolle (unbehandelte Zellen; gestrichelte Linie). Die relative Proliferation (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) wurde berechnet, indem pro Probe der Quotient zur Negativkontrolle gebildet wurde. Die technischen Triplikate wurden vor durchflusszytometrischer Analyse vereinigt.

Eine MitC-Konzentration von 75 µg/ml resultierte in einer optimalen Inhibierung (91,36 %) der Stimulator-Zellpopulation und wirkte einer Stimulation mit bis zu 4 µg/ml ConA entgegen. Diese MitC-Konzentration stellte sich somit für die Etablierung des Stimulatorzellpools als geeignet heraus und wurde infolgedessen für folgende MLR-Experimente zur Inhibierung der Proliferation allogener PBMCs eingesetzt. Die inhibierende Wirkung von MitC auf die Zellproliferation der eingesetzten Stimulator-PBMCs wurde zu jedem Analysezeitpunkt kontrolliert.

3.2.2 Gemischte Lymphozytenreaktion – Klassische MLR

Für die Untersuchung der in einem *in vitro* System maximal induzierbaren primären T-Zell-Reaktion wurden T-Lymphozyten in Anwesenheit von allogenen PBMCs kultiviert und nach sechs Tagen auf ihre Proliferation und CD25-Expression analysiert. Hierzu wurden sowohl unterschiedliche Zellzahlverhältnisse von T-Lymphozyten (*Responder*-Zellpopulation) zu PBMCs (Stimulator-Zellpopulation) als auch eine Kultivierung auf unterschiedlichen

Plattentypen (96-Well-Flachboden- und Rundbodenplatten) untersucht, um eine optimale Kokultivierung für eine maximale T-Zell-Stimulation zu gewährleisten. Dargestellt sind im Folgenden die Ergebnisse der Analyse variierender Stimulator-Zellzahlen (1×10^5 , 2×10^5 , 5×10^5 und 10×10^5 / 200 μ l) bei einer definierten *Responder*-Zellzahl von 1×10^5 / 200 μ l (Abb. 40).

Eine Variation der *Responder*- bei festgelegter Stimulator-Zellzahl induzierte niedrigere T-Zell-Proliferationen und CD25-Expressionen (Daten nicht gezeigt). Ergänzend zu den Ansätzen der MLR wurde eine Monokultur *Responder*- (T_H -) Zellen sowohl mit als auch ohne ConA-Stimulation mitgeführt (Abb. 40A). Diese Monokulturen dienten der Kontrolle einer möglichen induzierbaren Proliferation und zugleich zur Überprüfung der Vitalität der T_H -Zellen. Die Ergebnisse zeigten eine Proliferation der *Responder*- (T_H -) Zellen nach Stimulation mit 4 μ g/ml ConA von 36,5 %, wohingegen unter den unbehandelten T_H -Zellen 2,6 % proliferierten.

Die Analyse der T_H -Zell-Proliferation im Rahmen der MLR mit variierenden Stimulator-Zellzahlen zeigte weder Unterschiede zwischen den Kokulturen auf Flachboden- und Rundbodenplatten, noch zwischen den eingesetzten Zellzahlen der Stimulator-PBMCs (Abb. 40B). Die einzige Ausnahme bildete die Kokultur mit einem Zellzahlverhältnis von 1:1 (*Responder*:Stimulatoren; R:S). Hier proliferierten auf der Flachbodenplatte 28,7 % der T_H -Zellen, wohingegen auf der Rundbodenplatte eine T-Zell-Proliferation von 64,1 % detektiert wurde. Bei den übrigen Zellzahlverhältnissen belief sich die Proliferation der T-Zellen auf den Flachbodenplatten auf 56,3 – 57,4 %. Die Anzahl PKH26-positiver Zellen lag bei den Rundbodenplatten mit 56,0 – 60,7 % im ähnlichen Bereich. In den korrespondierenden Monokulturen der Stimulator-PBMCs proliferierten, unabhängig von Zellzahl und Plattentyp, 0,7 – 6,2 % der Zellen. Bei den Monokulturen der *Responder*- (T_H -) Zellen ließ sich ein minimaler Unterschied im prozentualen Anteil proliferierender Zellen in Abhängigkeit vom gewählten Plattentyp erkennen (Flachboden: 0,5 %; Rundboden: 1,5 %). Mit Hilfe des berechneten Stimulationsindex (SI; Abb. 40C) werden diese Ergebnisse in Form eines Liniendiagramms zusammengefasst. Es wurde eine maximale Stimulation der T_H -Zellen in den MLR-Ansätzen auf Flachbodenplatten bei Kokulturen mit einem Zellzahlverhältnis von 1:2 (R:S) (SI: 114,4), 1:5 (SI: 112,6) und 1:10 (SI: 114,8) detektiert. Die Stimulationsindizes der T_H -Zellen in den Kokulturen auf Rundbodenplatten lagen, unabhängig vom Zellzahlverhältnis, bei durchschnittlich $39,75 \pm 2,37$.

Die Analyse der CD25-Expression der T_H -Zellen in der MLR mit variierenden Stimulator-Zellzahlen erfolgte in separaten Wells (ohne PKH26-Markierung). Die Ergebnisse zeigten kaum Unterschiede zwischen den Kokulturen auf Flachboden- und Rundbodenplatten (Abb. 40D). Die prozentualen Anteile CD25-exprimierender T-Zellen unterschieden sich jedoch in Abhängigkeit von der eingesetzten Stimulator-Zellzahl. Ein Zellzahlverhältnis von 1:10 (R:S) brachte einen geringeren Anteil CD25-positiver T_H -Zellen im Vergleich zu den übrigen analysierten Zellzahlverhältnissen hervor (Flachbodenplatte: 16,1 %; Rundbodenplatte: 12,3 %). Eine

maximale Induktion der CD25-Expression konnte durch eine Kokultivierung von T_H-Zellen mit allogenen PBMCs in einem Zellzahlverhältnis von 1:2 erreicht werden (Flachbodenplatte: 34,4 %; Rundbodenplatte: 32,3 %). Mit einem Anteil CD25-exprimierender T-Zellen von 30,2 % (Flachbodenplatte) und 29,9 % (Rundbodenplatte) bei einem Zellzahlverhältnis von 1:1 und einem Anteil von 29,4 % (Flachbodenplatte) und 32,0 % (Rundbodenplatte) bei einem Verhältnis von 1:5, lagen diese Kokulturen im mittleren Bereich der induzierten CD25-Expression. In den korrespondierenden Monokulturen der Stimulator-PBMCs exprimierten maximal 3,0 % (Flachbodenplatte) bzw. 3,5 % (Rundbodenplatte) der Zellen CD25. Bei den Monokulturen der *Responder*- (T_H-) Zellen wurde CD25 von maximal 0,2 % der Zellen exprimiert (Abb. 40D, im Balkendiagramm nicht sichtbar).

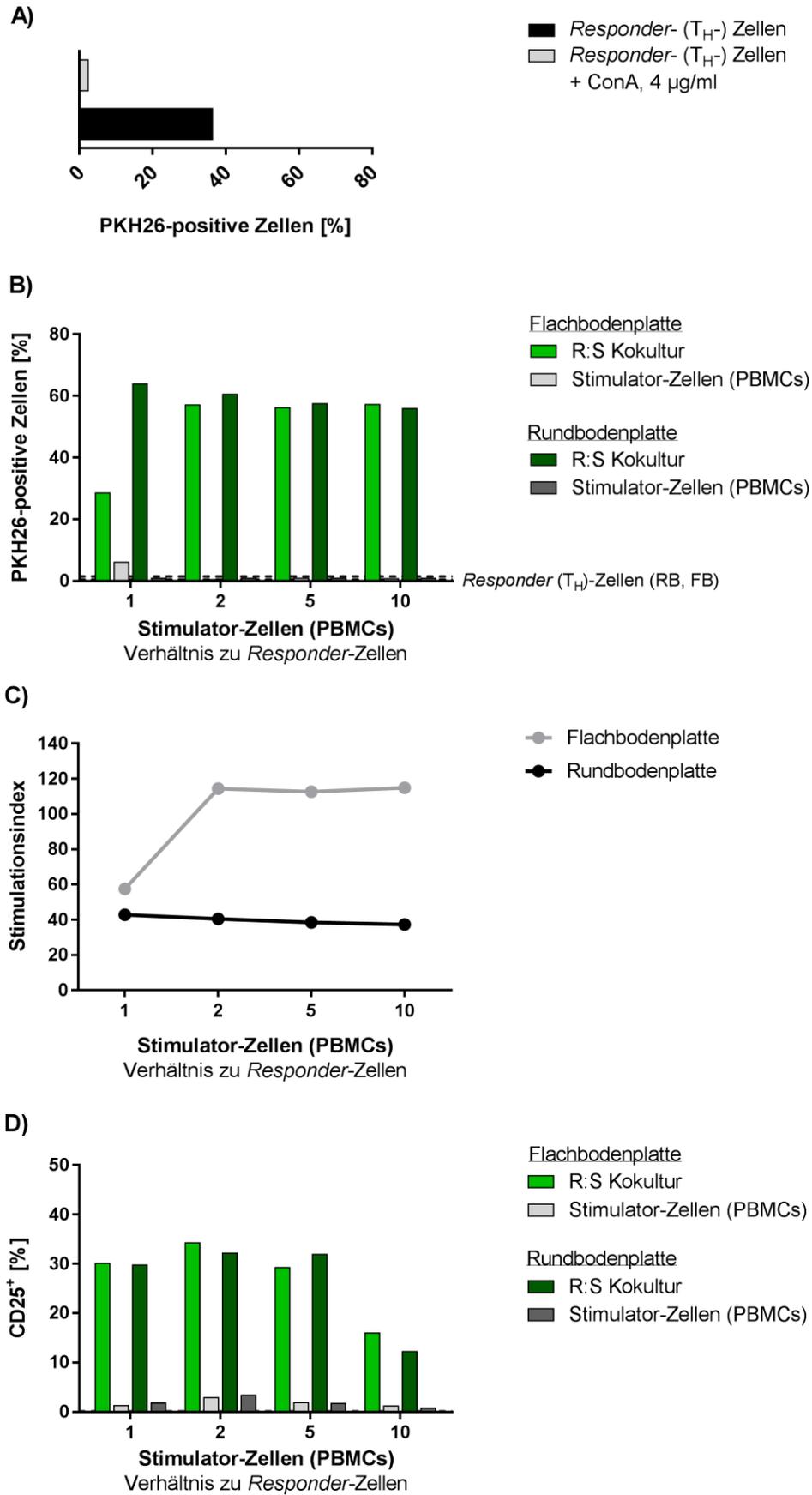


Abbildung 40: Gemischte Lymphozytenreaktion – Analyse der Proliferation und CD25-Expression von T_H -Zellen nach sechstägiger MLR. Responder- ($CD4^+$ / T_H -) Zellen wurden für sechs Tage mit allogenen PBMCs (Stimulatorzellen) kokultiviert. Zur Inhibierung der Proliferation der Stimulator-Zellpopulation wurde diese vor

Kultivierung mit 75 µg/ml MitC behandelt. Zur Detektion der T-Zell-Proliferation wurden die *Responder*- (T_H -) Zellen zuvor mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff PKH26 markiert. Als Proliferationskontrolle der MitC-behandelten PBMCs wurden diese für eine Monokultur ebenfalls mit PKH26 markiert. Die Kokultivierung erfolgte in unterschiedlichen Zellzahlverhältnissen von *Responder*- zu Stimulatorzellen (R:S), sowohl auf 96-Well-Flachboden- als auch Rundbodenplatten. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch an Tag 6. Die Balkendiagramme zeigen den prozentualen Anteil an proliferierten, PKH26-positiven (A, B) und aktivierten, CD25-positiven Zellen (D); (n=1). A) Proliferation von *Responder*- (T_H -) Zellen in einer Monokultur (+/- ConA [4 µg/ml]) zur Überprüfung der Vitalität (Rundbodenplatte). B) PKH26-positive *Responder*-Zellen (1×10^5 ; grüne Balken) in einer Kokultur mit variierender Zellzahl Stimulator-PBMCs (1×10^5 , 2×10^5 , 5×10^5 und 10×10^5 ; x-Achse) und PKH26-positive Stimulator-Zellen in Monokultur (graue Balken). C) Zusätzlich wurde der Stimulationsindex der jeweiligen Ansätze bestimmt (Liniendiagramm), indem der Quotient aus den prozentualen Anteilen PKH26-positiver Zellen in Kokultur und der jeweiligen Kontrolle (Monokultur der korrespondierenden Zellzahl an *Responder*-Zellen) gebildet wurde. D) CD25-Expression von *Responder*-Zellen (1×10^5 ; grüne Balken) in einer Kokultur mit variierender Zellzahl Stimulator-PBMCs (1×10^5 , 2×10^5 , 5×10^5 und 10×10^5 ; x-Achse) und CD25-Expression der jeweiligen Stimulator-Zellen in Monokultur (graue Balken). Die gestrichelten Linien im Balkendiagramm (B) stellen die Hintergrundproliferation der Monokultur von *Responder*-Zellen der jeweiligen Ansätze (Flach- und Rundbodenplatten) dar. Aufgrund der sehr niedrigen CD25-Hintergrundexpression von *Responder*-Zellen in Monokultur sind diese im Balkendiagramm (D) nicht sichtbar.

Mit diesem *in vitro* Modell war es somit möglich, eine deutliche primäre Immunantwort auf xenogene Proteine zu detektieren. Hierbei erwies sich eine Kokultur von T-Lymphozyten mit allogenen PBMCs in einem Zellzahlverhältnis von 1:2 (*Responder*- (T_H -) Zellen:Stimulator-PBMCs) auf Flachbodenplatten als geeignet, um *in vitro* eine maximale primäre T-Zell-Reaktion zu induzieren.

Folgend galt es zu untersuchen, ob dieses System auch die Induktion einer sekundären Immunreaktion durch den wiederholten Kontakt mit einem antigenen Stimulus ermöglicht.

3.2.3 MLR Restimulation – erweiterte MLR

Die „erweiterte MLR“ basierte auf einer verlängerten klassischen MLR (Abb. 41). T-Lymphozyten wurden an Tag 0 mit allogenen PBMCs für eine Dauer von 12 Tagen kultiviert. Im Gegensatz zur klassischen MLR erfolgte an Tag 6 der Kultur ein wiederholter Kontakt mit dem antigenen Stimulus durch Restimulation der T-Lymphozyten mit weiteren allogenen PBMCs. Als Kontrollansätze dienten je eine klassische MLR über eine Kultivierungsdauer von sechs und 12 Tagen (Abb. 41A, B) sowie eine Monokultur der PBMCs, die an Tag 6 für eine Restimulation der T-Lymphozyten eingesetzt wurden (Restimulator-PBMCs; Abb. 41C). Bei den Ansätzen der klassischen (A, B) und der erweiterten MLR (Abb. 41D) wurden sowohl die T_H -Zellen in den jeweiligen Kokulturen als auch die T_H -Zellen und Stimulator-PBMCs aus den Monokulturen analysiert. Es ist zu beachten, dass die Ansätze der Monokulturen von T_H -Zellen und PBMCs in der erweiterten MLR (Abb. 41D) an Tag 6 ebenfalls den Stimulus durch die Zugabe allogener PBMCs erhielten. Dies entsprach hier einer ersten Stimulation an Tag 6, während es für die T_H -Zellen, die von Tag 0 an in Kokultur waren, eine Restimulation darstellte.

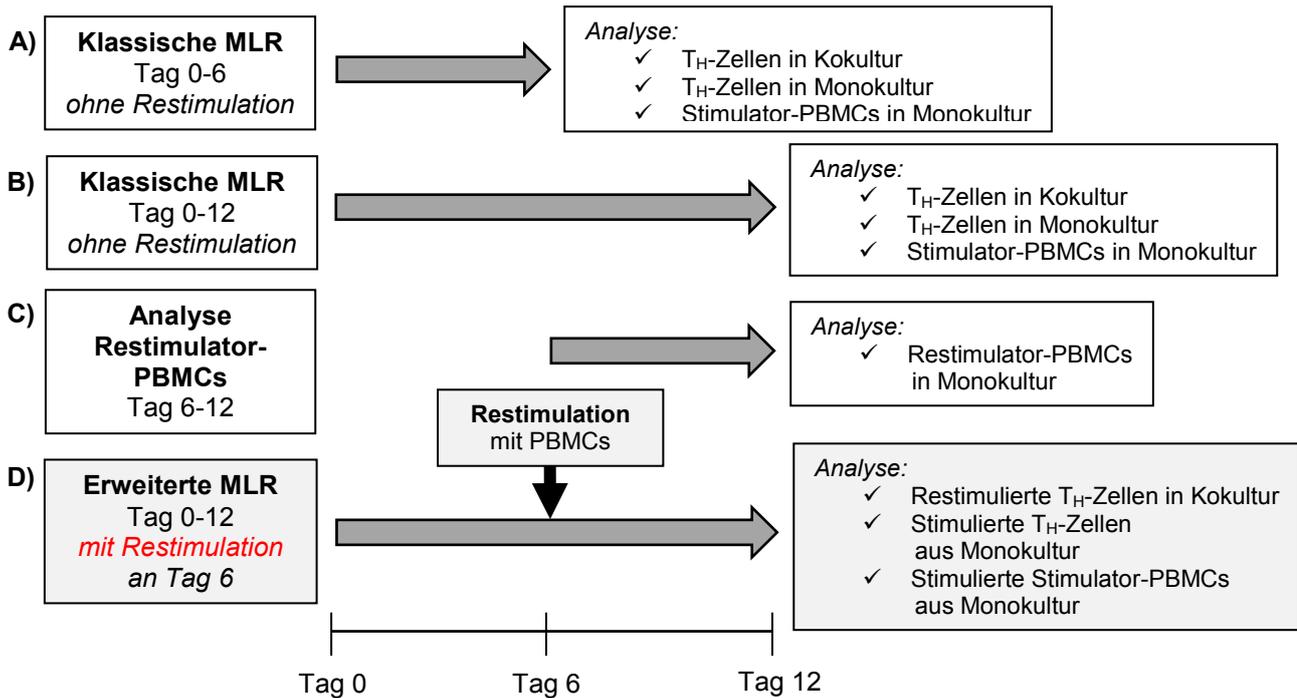


Abbildung 41: Schema der Ansätze und analysierten Endpunkte der erweiterten MLR zur *in vitro* Stimulation von T-Lymphozyten. A) Klassische MLR über sechs Tage (Tag 0 - 6). B) Klassische MLR über 12 Tage (Tag 0 - 12). C) Analyse der Monokultur von allogenen PBMCs für die Restimulation an Tag 6 im Rahmen der erweiterten MLR (Tag 6 - 12). D) Erweiterte MLR über 12 Tage (Tag 0 - 12). Bei der erweiterten MLR wurden die Zellen für eine verlängerte Kultivierungsdauer von 12 Tagen kokultiviert. An Tag 6 erfolgte eine wiederholte Stimulation mit weiteren allogenen PBMCs. A-C stellen somit Kontrollansätze der erweiterten MLR dar. In allen Ansätzen dienten mitgeführte Monokulturen der einzelnen Zelltypen als Kontrolle.

Parallel zu den in Abb. 41 aufgezeigten Ansätzen und analysierten Endpunkten erfolgte eine Proliferationskontrolle der Stimulator-PBMCs zu den unterschiedlichen Analysezeitpunkten des Experimentes (Abb. 42). Ziel war es, die inhibierende Wirkung von MitC auf die Proliferation der PBMCs für jeden Ansatz sicherzustellen. Um dies zu erreichen, wurden sowohl MitC-unbehandelte als auch MitC-behandelte PBMCs mit und ohne ConA-Stimulus kultiviert und auf ihre Proliferation analysiert. Eine Kultivierung von MitC-unbehandelten PBMCs ohne ConA Stimulus resultierte, unabhängig vom Kultivierungszeitpunkt und der Kultivierungsdauer, in einer mittleren Proliferation von 14,0 % ($\pm 3,83$) (Abb. 42A). Diese Proliferation stieg durch eine ConA-Stimulation auf durchschnittlich 86,13 % ($\pm 6,37$), also auf das 6,15-fache, an. Eine vorangegangene Behandlung der PBMCs mit MitC (75 $\mu\text{g/ml}$) konnte der ConA-induzierten Proliferation zu jedem Zeitpunkt entgegenwirken (Abb. 42B). Somit wurde die Proliferation auf durchschnittlich 9,68 % ($\pm 4,77$) reduziert. Den höchsten Anteil proliferierender Zellen zeigte Ansatz D (Tag 0 - 12, mit Restimulation) mit 16,1 %. Hier wurden die an Tag 0 mit ConA kultivierten PBMCs, analog zur erweiterten MLR, an Tag 6 nochmals mit ConA restimuliert. Auch auf die Proliferation der ConA-unstimulierten PBMCs wirkte MitC inhibierend und dezimierte diese auf durchschnittlich 3,50 % ($\pm 2,23$).

So wurde sichergestellt, dass eine induzierte T-Zell-Aktivierung nicht durch eine eventuelle Proliferation der allogenen PBMCs überschätzt oder beeinflusst wird.

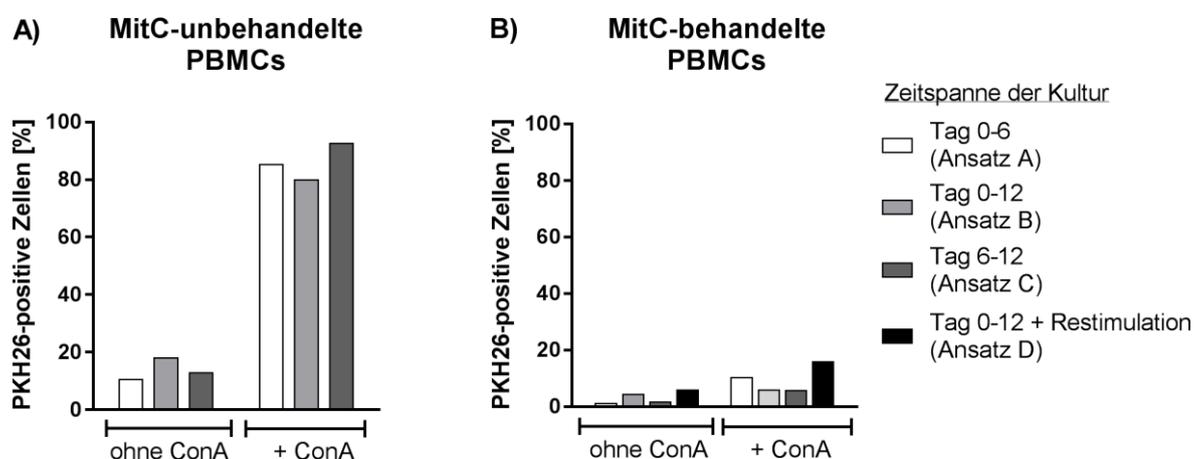


Abbildung 42: Kontrolle der Proliferation der (Re-)Stimulator-PBMCs zu unterschiedlichen Zeitpunkten der erweiterten MLR. Proliferation von A) MitC-unbehandelten PBMCs, +/- ConA und B) MitC-behandelten PBMCs, +/- ConA zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 0 - 6, Tag 0 - 12, Tag 6 - 12, Tag 0 - 12 + Restimulation). (Re-)Stimulator-Zellen (2×10^5 / 200 μ l) wurden mittels Fluoreszenzfarbstoff PKH26 markiert und +/- ConA [2 μ g/ml] auf 96-Well-Flachbodenplatten kultiviert. Die Analyse der Proliferation erfolgte durchflusszytometrisch. Die Balkendiagramme zeigen den prozentualen Anteil an proliferierten (PKH26-positiven) Zellen. Die technischen Duplikate wurden vor durchflusszytometrischer Analyse vereinigt.

Die Ergebnisse der erweiterten MLR zeigten den Einfluss einer wiederholten Stimulation der T-Lymphozyten mit allogenen PBMCs auf die Proliferation und CD25-Expression der T_H -Zellen (Abb. 43).

ConA-stimulierte T_H -Zellen bildeten in diesem Experiment die Positivkontrolle (PK) und zeigten nach sechs Tagen in Kultur einen Anteil PKH26-positiver Zellen von 60,6 % und eine CD25-Expression von 21,3 %. Bei einer verlängerten Kultivierungsdauer von 12 Tagen lagen die prozentualen Werte für beide Endpunkte niedriger (PKH26: 44,1 %; CD25: 4,9 %). Die Kokultivierung der T_H -Zellen mit allogenen, MitC-behandelten PBMCs resultierte in einer T-Zell-Proliferation von 49,5 % nach sechstägiger (Abb. 43A; Tag 0 - 6) und von 81,9 % nach 12-tägiger Kultivierungsdauer (Induktion: 1,66-fach; Abb. 43B; Tag 0 - 12). Invers hierzu nahm die CD25-Expression von 49,3 % nach sechs Tagen auf 14,7 % nach 12 Tagen ab (Reduktion: 3,35-fach). Die Anteile PKH26-positiver *Responder*- (T_H -) Zellen und Stimulator-PBMCs in Monokultur nahmen mit zunehmender Kultivierungsdauer minimal zu (*Responder*: 1,8 % (Tag 6) vs. 11,3 % (Tag 12); Stimulator-PBMCs: 1,4 % (Tag 6) vs. 4,6 % (Tag 12)). Noch geringer fiel der Einfluss der Kultivierungsdauer auf die CD25-Expression der Zellen in Monokultur aus (*Responder*: 1,3 % (Tag 6) vs. 2,3 % (Tag 12); Stimulator-PBMCs: 3,0 % (Tag 6 und 12)).

Eine Restimulation (Abb. 43C) der ConA-stimulierten T_H -Zellen (PK) an Tag 6 mit ConA steigerte die Proliferation auf 60,1 % an Tag 12 und somit um das 1,36-fache im Vergleich zur

Proliferation nach 12 Tagen ohne Restimulation (Abb. 43B). Auch die CD25-Expression stieg um ein 2,08-faches an (10,2 %). Die Restimulation der mit allogenen, MitC-behandelten PBMCs kokultivierten T_H-Zellen mit weiteren PBMCs hatte kaum Einfluss auf ihre Proliferation (Abb. 43C). Der Anteil proliferierter T_H-Zellen an Tag 12 betrug 83,6 % und unterschied sich somit um 1,7 % von der Proliferation an Tag 12 ohne Restimulation (81,9 %). Die CD25-Expression hingegen nahm, im Vergleich zu den nicht restimulierten T_H-Zellen, um ein 1,40-faches zu (ohne Restimulation: 14,7 %; mit Restimulation: 20,6 %). Dennoch lag diese um ein 2,39-faches niedriger als an Tag 6 (Abb. 43A). Zu beachten ist, dass dieser Stimulus an Tag 6 für die Zellen in Monokultur eine erste Stimulation darstellte. Diese induzierte bei den zuvor monokultivierten *Responder*- (T_H-) Zellen eine Proliferation von 66,5 % und eine CD25-Expression von 49,3 %. Die Werte der T_H-Zell-Proliferation lagen somit zwischen den Werten der für sechs Tage kokultivierten T_H-Zellen (49,5 %) und denen nach 12 Tagen Kokultur (81,9 %; jeweils erster und einziger Stimulus an Tag 0). Die CD25-Expression entsprach der Expression nach Kokultivierung der T_H-Zellen mit allogenen PBMCs von Tag 0 – 6. Bei den zuvor monokultivierten Stimulator-PBMCs resultierte die Zugabe weiterer PBMCs an Tag 6 in einem minimalen Anstieg PKH26-positiver Zellen auf 11,4 % und CD25-positiver Zellen auf 22,3 %.

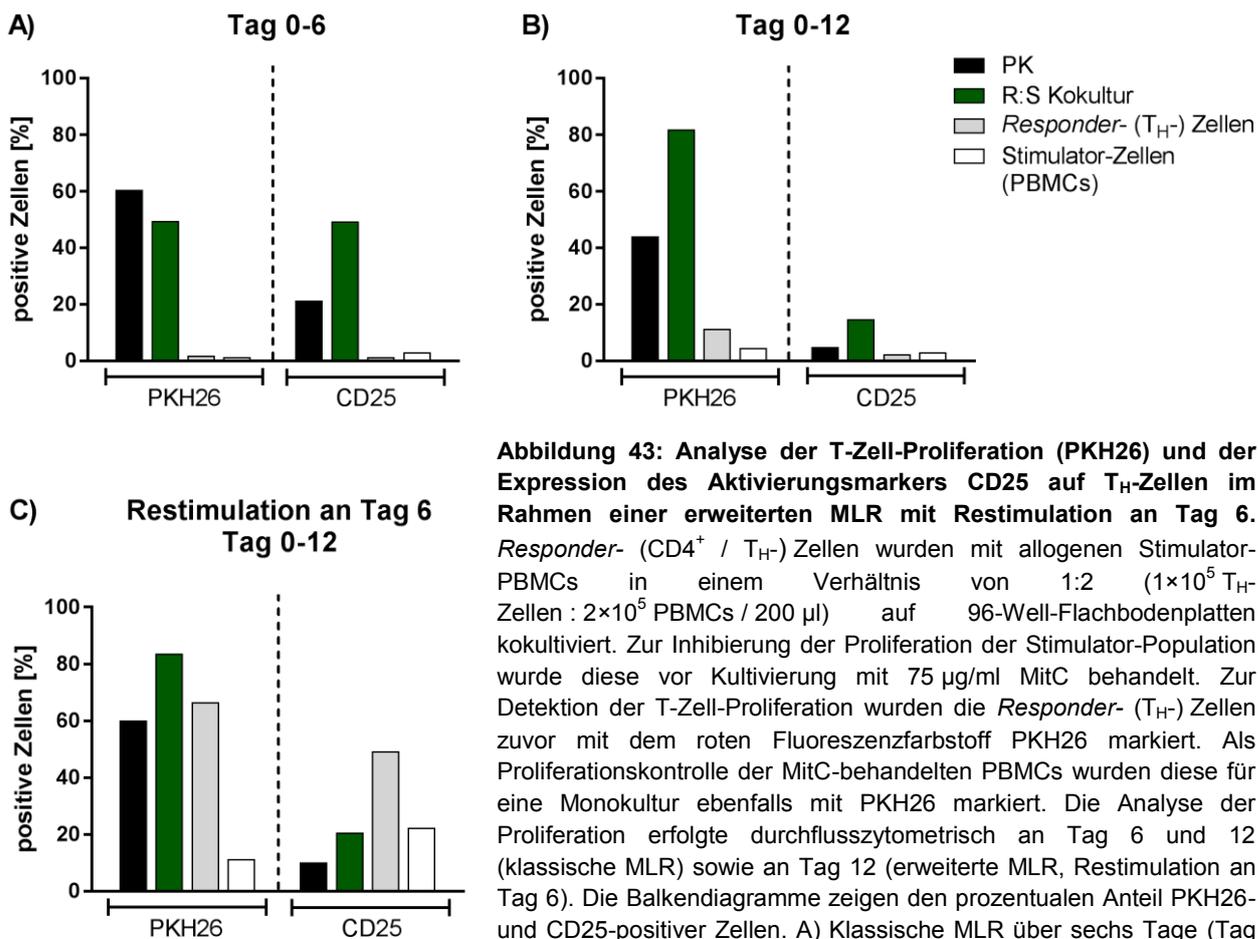


Abbildung 43: Analyse der T-Zell-Proliferation (PKH26) und der Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf T_H-Zellen im Rahmen einer erweiterten MLR mit Restimulation an Tag 6.

Responder- (CD4⁺ / T_H-) Zellen wurden mit allogenen Stimulator-PBMCs in einem Verhältnis von 1:2 (1×10^5 T_H-Zellen : 2×10^5 PBMCs / 200 μ l) auf 96-Well-Flachbodenplatten kokultiviert. Zur Inhibierung der Proliferation der Stimulator-Population wurde diese vor Kultivierung mit 75 μ g/ml MitC behandelt. Zur Detektion der T-Zell-Proliferation wurden die *Responder-* (T_H-) Zellen zuvor mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff PKH26 markiert. Als Proliferationskontrolle der MitC-behandelten PBMCs wurden diese für eine Monokultur ebenfalls mit PKH26 markiert. Die Analyse der Proliferation erfolgte durchflusszytometrisch an Tag 6 und 12 (klassische MLR) sowie an Tag 12 (erweiterte MLR, Restimulation an Tag 6). Die Balkendiagramme zeigen den prozentualen Anteil PKH26- und CD25-positiver Zellen. A) Klassische MLR über sechs Tage (Tag 0 - 6). B) Klassische MLR über 12 Tage (Tag 0 - 12). C) Erweiterte MLR über 12 Tage mit Restimulation durch Stimulator-PBMCs an Tag 6 (1/4 der ursprünglichen Zellzahl an PBMCs).

Schwarze Balken: Positivkontrolle (PK; T_H-Zellen + ConA [2 μ g/ml]); Grüne Balken: proliferierte T_H-Zellen aus Kokultur; Graue Balken: proliferierte T_H-Zellen aus Monokultur; Weiße Balken: proliferierte Stimulator-PBMCs aus Monokultur). Die technischen Duplikate wurden vor durchflusszytometrischer Analyse vereinigt.

3.3 Cytokine Release Assay

Ein weiteres *in vitro* Testsystem zur Detektion potenzieller Immunogenität von Biologika stellt der *Cytokine Release Assay* (CRA) dar.

Für die Etablierung eines CRAs wurden in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Assayformate mit humanen Zellen untersucht, um systemische Zytokinfreisetzen als adverse Reaktion auf therapeutische mAk zu detektieren: die Vollblut-Methode und die PBMC-Methode. Es galt zu ermitteln, ob die im Rahmen dieser *in vitro* Testsysteme induzierten Reaktionen mit den Potenzen der jeweiligen mAk, in der klinischen Anwendung eine Zytokinfreisetzung zu induzieren, vergleichbar sind. Bei den untersuchten therapeutischen mAk handelte es sich um Remicade, MabThera, OKT3 und ANC28.1. Zusätzlich diente Erbitux, als klinisch unauffälliger mAk, in den folgenden Versuchen als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde ein kombinierter Stimulus aus dem Endotoxin LPS [1 µg/ml] und dem Mitogen PHA [5 µg/ml] verwendet.

3.3.1 Methodenoptimierung

3.3.1.1 Etablierung der optimalen Stimulationsdauer

Im Rahmen der Vollblut-Methode wurde Vollblut einzelner Donoren *in vitro* mit 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml der löslichen mAk inkubiert. Bei der PBMC-Methode wurden die mAk vor einer Stimulation der Zellen ü.N. auf dem Wellboden immobilisiert.

In einem ersten Versuchsansatz erfolgte für beide Methoden die Etablierung einer optimalen Stimulationsdauer von 24 Stunden (repräsentative Darstellung anhand der Vollblut-Methode: Abb. 44). Hier wurde beim überwiegenden Anteil der Zytokine eine maximale oder eine mit einer 48-stündigen Stimulation vergleichbare Sekretion induziert. Lediglich IL-2 zeigte eine maximale Konzentration nach sechsständiger Stimulation der Zellen mit ANC28.1. Mit zunehmender Stimulationsdauer nahm die detektierte IL-2-Konzentration ab.

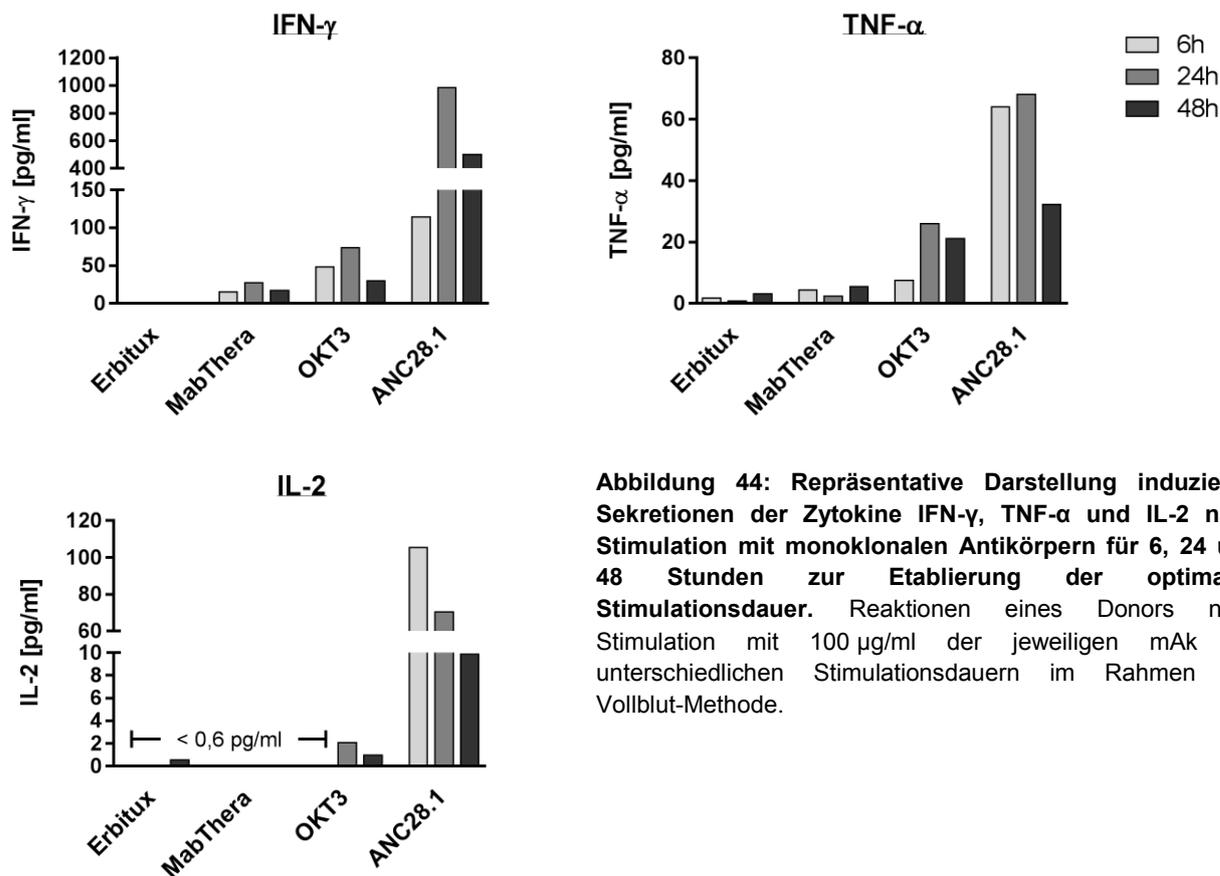


Abbildung 44: Repräsentative Darstellung induzierter Sekretionen der Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2 nach Stimulation mit monoklonalen Antikörpern für 6, 24 und 48 Stunden zur Etablierung der optimalen Stimulationsdauer. Reaktionen eines Donors nach Stimulation mit 100 μ g/ml der jeweiligen mAk bei unterschiedlichen Stimulationsdauern im Rahmen der Vollblut-Methode.

3.3.1.2 Einfluss unterschiedlicher Zellkulturplatten auf die Zytokinsekretion von PBMCs

In einem weiteren Versuchsansatz wurde überprüft, ob die Verwendung von Zellkulturplatten unterschiedlicher Materialien Einfluss auf die Zytokinsekretion im Rahmen der PBMC-Methode hat. Hierzu wurden Polystyren (PS)- mit Polypropylen (PP)-Mikrotiterplatten verglichen. Die Zellkulturüberstände wurden nach 24-stündiger Stimulation der PBMCs mit 10 μ g/ml des jeweiligen immobilisierten mAKs auf ihren Zytokingehalt analysiert. Repräsentativ für das gesamte Zytokinpanel sind im Folgenden die Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-2 und IL-1 β dargestellt (Abb. 45).

Eine Stimulation der PBMCs sowohl mit immobilisiertem Erbitux als auch mit MabThera resultierte in einer erhöhten Zytokinsekretion bei Verwendung von PP-Platten im Vergleich zu PS-Platten. Diese Induktion fiel beim Zytokin IL-2 am geringsten aus (Erbitux: 4,0-fache; MabThera: 2,45-fache).

Den geringsten Einfluss hatte die Wahl des Plattentypen auf die TNF- α - und IL-1 β -Sekretionen nach Stimulation der PBMCs mit OKT3. Im Vergleich zu den IFN- γ - und IL-2-Sekretionen durch PBMCs auf PP-Platten, wurden diese Zytokine auf PS-Platten hingegen verstärkt sezerniert. Bei IL-2 war dieser Unterschied signifikant.

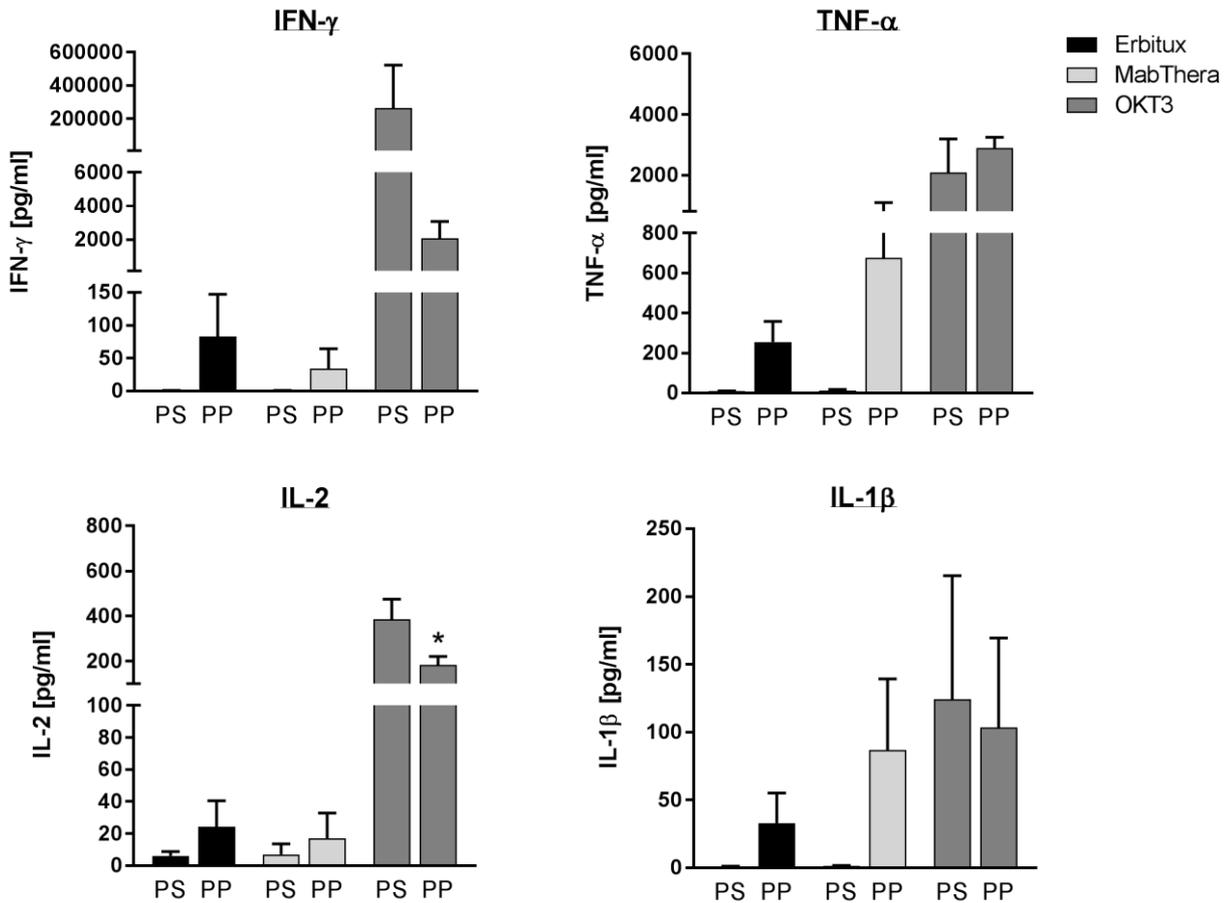


Abbildung 45: Vergleich des Einflusses von Polystyren (PS)- und Polypropylen (PP)-Platten auf die Sekretion der Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-2 und IL-1 β durch PBMCs nach Stimulation mit immobilisierten monoklonalen Antikörpern. Revitalisierte PBMCs wurden für 24 Stunden mit mAk (Erbitux, MabThera, OKT3) in einer Konzentration von 10 μ g/ml stimuliert. Hierzu wurden die Antikörper zuvor sowohl auf PS- als auch auf PP-Mikrotiterplatten immobilisiert (*wet-coat*). Aus technischen Triplikaten wurde der arithmetische Mittelwert gebildet. Die Daten zeigen die medianen Konzentrationen der jeweiligen Zytokine \pm SEM, n=2. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur, bezogen auf die korrespondierenden Ansätze auf PS-Platten der jeweiligen Behandlungsgruppe, ermittelt: * p<0,05.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die unterschiedlichen Materialien der Mikrotiterplatten Einfluss auf die induzierte Zytokinsekretion haben. Die Verwendung von PP-Zellkulturplatten resultierte bei Stimulation der PBMCs mit immobilisiertem Erbitux und MabThera in höheren Zytokinsekretionen als eine Verwendung von PS-Platten. Bei OKT3 waren die gemessenen Zytokinkonzentrationen bei Verwendung von PS-Platten entweder höher oder unterschieden sich kaum von denen auf PP-Platten.

Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurden für nachfolgende Experimente PS-Mikrotiterplatten verwendet. Ausschlaggebend hierfür war insbesondere die erhöhte Zytokinsekretion durch PBMCs auf PP-Platten nach Stimulation mit immobilisiertem Erbitux, einem für Zytokinfreisetzen klinisch unauffälligen mAk. Zudem zeigten darauf folgende Testdurchgänge mit ANC28.1, dass dieser auch auf PS-Platten deutlich detektierbare

Reaktionen induzierte (Daten nicht gezeigt). Dies wird auch aus den folgend dargestellten Ergebnissen (Kap. 3.3.1.3) ersichtlich.

3.3.1.3 Analyse induzierter Zytokinsekretionen

Für eine Analyse der induzierten Zytokinsekretionen wurden die durch die verschiedenen mAk induzierten Zytokinkonzentrationen mit denen nach Erbitux-Stimulation verglichen. Dies erfolgte durch die Festlegung eines Schwellenwertes, basierend auf dem 95. Perzentil der Reaktionen aller Donoren auf Erbitux. Zytokinsekretionen über dem 95. Perzentil der Sekretionen bei korrespondierender Erbitux-Konzentration wurden folglich als positiv erachtet. Diese Schwellenwert-Analyse wird exemplarisch anhand der Vollblut-Methode am Zytokin IL-10, nach Stimulation mit Remicade und ANC28.1, verdeutlicht (Abb. 46). Sowohl eine Stimulation mit steigenden Remicade- (Abb. 46A) als auch ANC28.1-Konzentrationen (Abb. 46B) führten zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg des prozentualen Anteils positiver Reaktionen im Vergleich zu Erbitux. Deutliche Unterschiede lagen hier im Ausmaß der Reaktionen. Remicade induzierte bei maximaler Konzentration (100 µg/ml) 37,5 % positive Reaktionen. Nach Stimulation mit ANC28.1 reagierten bei gleicher Konzentration 100 % aller acht Donoren positiv. Die von Remicade und ANC28.1 induzierten Reaktionen unterschieden sich auch in Bezug auf die absoluten Zytokinkonzentrationen. Während die absoluten IL-10-Konzentrationen nach Stimulation mit Remicade im Bereich < 0,25 pg/ml lagen, induzierte ANC28.1 eine Sekretion von bis zu 232,66 pg/ml IL-10.

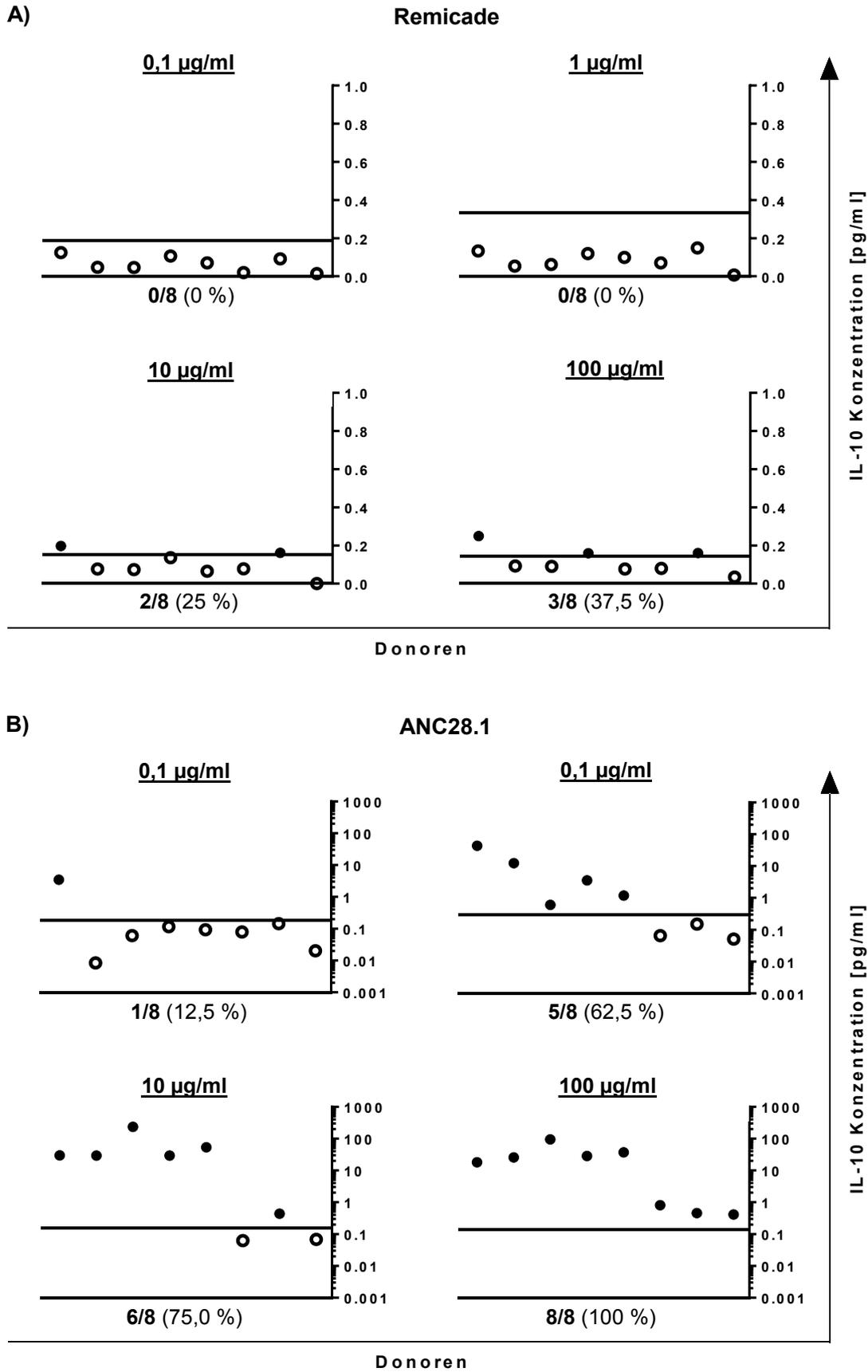


Abbildung 46: Induzierte Reaktionen am Beispiel der Sekretion des Zytokins IL-10. Reaktionen einer Kohorte aus acht Donoren. Vollblut einzelner Donoren wurde *in vitro* für 24 Stunden mit steigenden Konzentrationen Remicade (A) und ANC28.1 (B) stimuliert (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml). Die Bestimmung des Zytokingehalts in den Plasmaüberständen erfolgte mittels MSD. Dargestellt sind die mittleren IL-10 Konzentrationen

der technischen Duplikate der einzelnen Donoren. Ein Schwellenwert (schwarze, horizontale Linie) wurde basierend auf dem 95. Perzentil der Reaktionen aller Donoren auf Erbitux festgelegt. Zytokinsekretionen über dem 95. Perzentil der Sekretionen bei korrespondierender Erbitux-Konzentration wurden als positiv erachtet. Positive *Responder* sind durch ausgefüllte Datenpunkte gekennzeichnet.

Diese Schwellenwert-Analyse wurde für weitergehende Analysen genutzt. Die ermittelten Frequenzen positiv reagierender Donoren, d.h. Reaktionen oberhalb des mit Erbitux generierten Schwellenwertes, wurden anschließend gegen die mediane Zytokinkonzentration aller Donoren aufgetragen. Dies ermöglichte die zeitgleiche Betrachtung des prozentualen Anteils positiv reagierender Donoren und des Ausmaßes der sezernierten Zytokinkonzentrationen.

3.3.2 Vergleichende Analyse: Vollblut-Methode vs. PBMC-Methode

Nach erfolgter Etablierung einer optimalen Stimulationsdauer, des verwendeten Mikrotiterplattentypen sowie einer geeigneten Analyse induzierter Zytokinsekretionen wurden in einem nächsten Versuchsansatz die induzierten Reaktionen im Rahmen der Vollblut- und der PBMC-Methode verglichen. Dargestellt ist im folgenden Kapitel jeweils eine Auswahl der analysierten Zytokine.

Im Gegensatz zu veröffentlichten Studien, in denen üblicherweise lediglich ein polyklonaler Aktivator wie PHA (Findlay *et al.*, 2011a; Vessillier *et al.*, 2015) oder LPS (Bailey *et al.*, 2013) als Positivkontrolle eingesetzt wurde, erwies sich in der vorliegenden Arbeit ein kombinierter Stimulus aus LPS und PHA bei der Wahl der Positivkontrolle als geeignet. Bereits in frühen Jahren wurde dieser Stimulus sowohl an verdünntem Vollblut als auch an PBMCs untersucht und der Effekt mit dem jedes einzelnen polyklonalen Aktivators verglichen (De Groote *et al.*, 1992). Bei LPS handelt es sich um einen Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien. Es besteht aus einem O-Antigen, Polysacchariden und dem toxischen Lipid A (Endotoxin) und wirkt hauptsächlich über den TLR-4. LPS führt zur Induktion von Entzündungsreaktionen mit einhergehender Sekretion von Zytokinen wie beispielsweise TNF- α und IL-6 (Poltorak *et al.*, 1998; Hoshino *et al.*, 1999; Schwartz, 2001). Zudem ist bekannt, dass auch IL-10 als Reaktion auf LPS von den Zellen freigesetzt wird (Chang *et al.*, 2007; Dokter *et al.*, 1993). Bei PHA-L hingegen handelt es sich um ein Lektin aus der Kidneybohne (*Phaseolus vulgaris*), das Oligosaccharide auf der Zelloberfläche bindet. Seine vier L-Untereinheiten verfügen über eine hohe Affinität für Lymphozytenoberflächenrezeptoren und sind für die mitogenen Eigenschaften von PHA verantwortlich (Movafagh *et al.*, 2011). So führt PHA-L zu einer Stimulation von T-Lymphozyten, welche deren Proliferation und Produktion mitogener Faktoren zur Folge hat. Hierzu zählt unter anderem die Sekretion von Zytokinen wie IFN- γ , IL-2 und IL-4. Mit diesem kombinierten Stimulus konnte somit eine starke Induktion aller relevanten Zytokine erwartet werden.

Vollblut-Methode

Im Rahmen der Vollblut-Methode (Abb. 47) führte eine Stimulation mit LPS (1 µg/ml) und PHA (5 µg/ml) (Positivkontrolle) bei allen dargestellten Zytokinen zu einem prozentualen Anteil positiver Reaktionen von 100 % der Donoren. Mit Ausnahme der Zytokine IL-4 und IL-2 induzierte dieser kombinierte Stimulus bei allen weiteren Zytokinen (IFN-γ, TNF-α, IL-10 und IL-6) konzentrationsmäßig die höchsten Sekretionen, im Vergleich zu denen nach Stimulation mit den getesteten mAk.

Eine Stimulation der Zellen mit Remicade führte im Fall der Zytokine IFN-γ, IL-6 und IL-4 konzentrationsunabhängig zu einer Frequenz reagierender Donoren von ≤ 12,5 %. Bei IFN-γ kam es zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der medianen Zytokinkonzentration von 1,91 pg/ml auf 7,94 pg/ml (0,1 µg/ml – 100 µg/ml Remicade). Für IL-6 ließ sich trotz niedriger Konzentrationen ein konzentrationsabhängiger Anstieg verzeichnen (0,26 pg/ml [0,1 µg/ml] – 0,67 pg/ml [100 µg/ml]). Unabhängig von der eingesetzten Remicade-Konzentration wurden bei TNF-α keine positiven Reaktionen detektiert. Die Zytokinkonzentration des Schwellenwertes von Erbitux wurde hier demnach nicht überschritten (≤ 0,54 pg/ml). IL-10 zeigte mit 37,5 % bei maximaler Remicade-Konzentration (100 µg/ml) die höchste Frequenz an *Respondern*. Bei IL-2 reagierten maximal 25 % der Donoren positiv (10 µg/ml Remicade). Die Konzentrationen der Zytokine IL-10, IL-2 und IL-4 lagen bei < 0,1 pg/ml, unabhängig von der eingesetzten Substanzkonzentration.

MabThera induzierte eine Frequenz an *Respondern* im Bereich von 0 – 75 %. Mit Ausnahme von IL-10 konnten weder bei den Frequenzen positiver Reaktionen noch bei den medianen Zytokinkonzentrationen konzentrationsabhängige Aktivierungen verzeichnet werden. Bei IFN-γ nahm sowohl die Frequenz der *Responder* (von 50 % [0,1 – 1 µg/ml] auf 37,5 % [10 – 100 µg/ml]) als auch der sezernierte mediane Gehalt (von 56,21 pg/ml [0,1 µg/ml] auf 21,39 pg/ml [100 µg/ml]) ab. Ein prozentualer Anteil von 50 – 62,5 % aller Donoren reagierte mit einer konzentrationsunabhängigen medianen Sekretion von ≤ 2,25 pg/ml TNF-α auf MabThera. IL-6 wurde in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich (≤ 2,76 pg/ml), ebenfalls konzentrationsunabhängig, von 37,5 – 50 % der Donoren freigesetzt. IL-10 hingegen zeigte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Frequenz von 0 % (0,1 mg/ml) auf bis zu 75 % (100 µg/ml), in einem medianen Konzentrationsbereich von ≤ 0,18 pg/ml. Unabhängig von der eingesetzten MabThera-Konzentration reagierten maximal 37,5 % der Donoren mit IL-2- (≤ 0,13 pg/ml) und maximal 25 % mit IL-4-Sekretionen (≤ 0,05 pg/ml) positiv.

Bei OKT3 ließ sich für die Zytokine TNF-α, IL-10 und IL-6 ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Frequenzen positiv reagierender Donoren verzeichnen, wobei die Frequenzen nach Stimulation mit 1 µg/ml bzw. 10 µg/ml OKT3 identisch waren und erst bei maximaler OKT3-Konzentration (100 µg/ml) weiter anstiegen. Bei TNF-α stieg diese von 37,5 % bei der

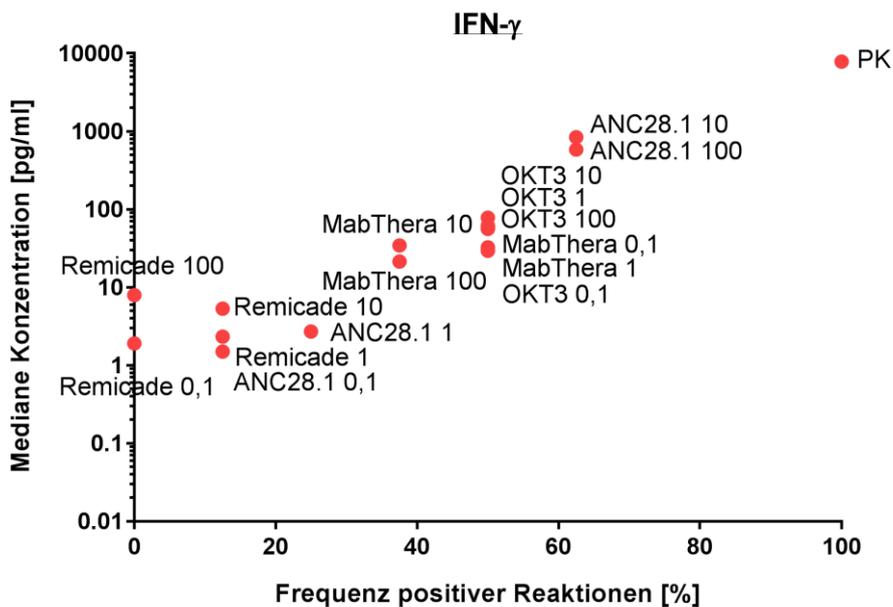
niedrigsten OKT3 Konzentration (0,1 µg/ml) auf 75 % bei maximaler Konzentration (100 µg/ml). Analog hierzu erhöhte sich auch der mediane TNF-α-Gehalt (von 1,0 pg/ml [0,1 µg/ml] auf 5,12 pg/ml [100 µg/ml]). IL-10 zeigte ähnliche Frequenzen wie TNF-α, nur dass hier eine maximale OKT3-Konzentration eine Frequenz von 100 % positiv reagierender Donoren induzierte (3,28 pg/ml). IL-6 zeigte einen Anstieg der Frequenzen von 25 % (0,1 µg/ml) auf 75 % (100 µg/ml) sowie einen Anstieg der medianen Zytokinkonzentrationen von 1,04 pg/ml (0,1 µg/ml) auf 11,77 pg/ml (100 µg/ml). Im Fall der Zytokine IFN-γ und IL-4 reagierte die Hälfte aller Donoren positiv auf OKT3, unabhängig von der eingesetzten Konzentration. Lediglich bei niedrigster OKT3-Konzentration reagierten 37,5 % der Donoren positiv mit einer IL-4 Sekretion. Während der Gehalt an IFN-γ im Bereich von 29,42 – 78,37 pg/ml lag, wurden maximal 0,13 pg/ml IL-4 sezerniert. Bei IL-2 reagierten 62,5 % (0,1 µg/ml; 10 µg/ml; 100 µg/ml) – 75 % (1 µg/ml) positiv mit medianen Konzentrationen von ≤ 0,78 pg/ml.

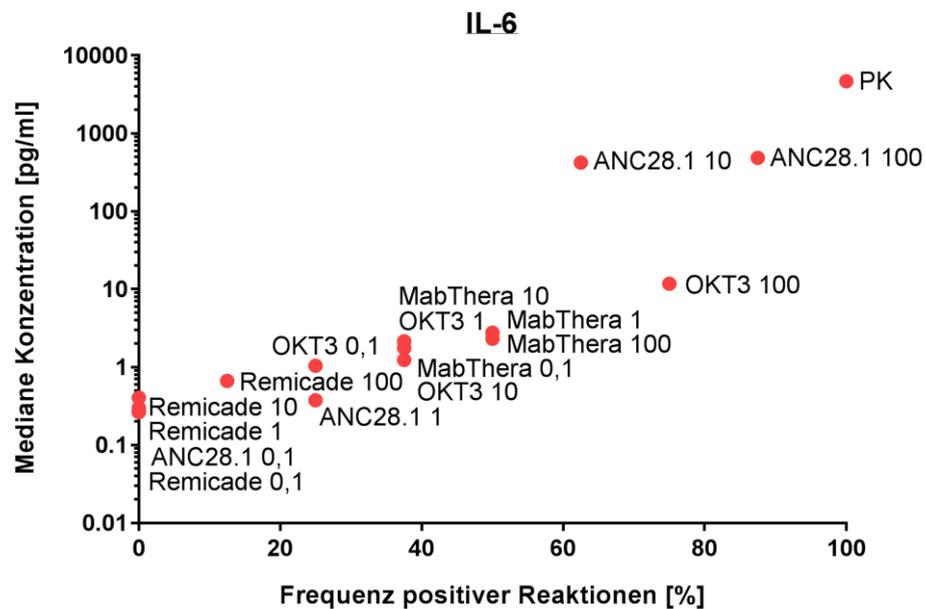
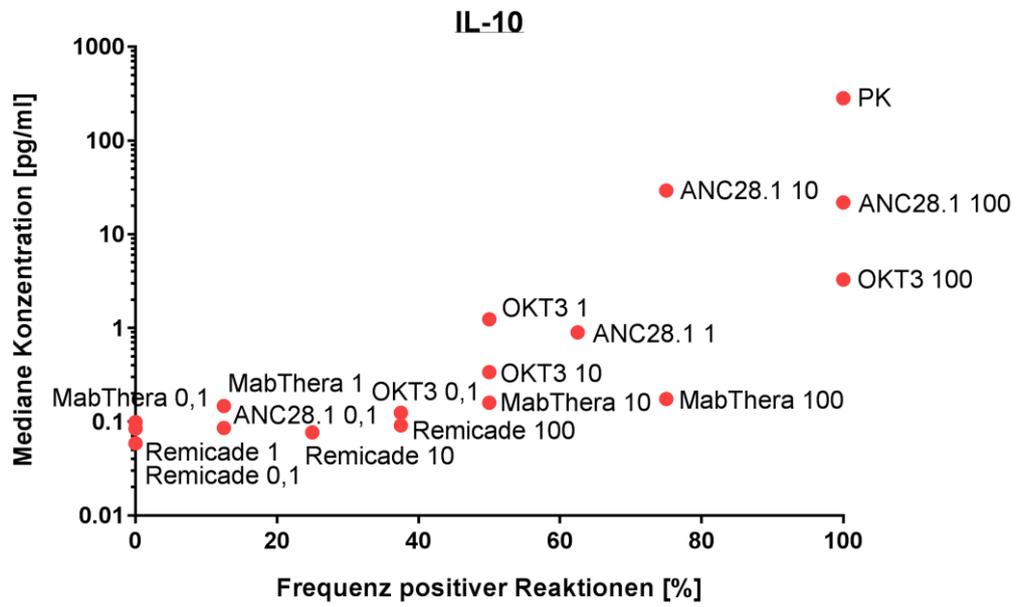
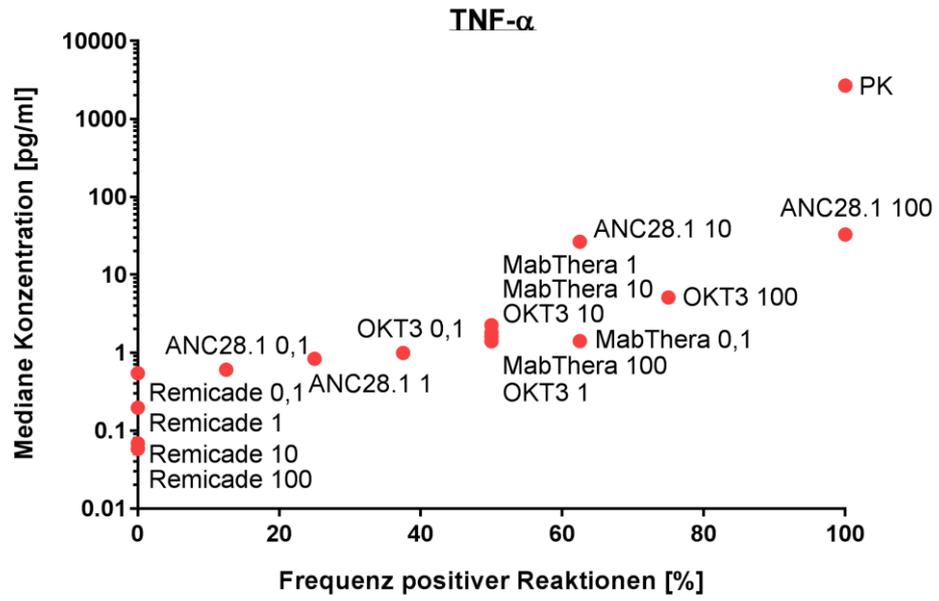
Eine Stimulation der Zellen mit ANC28.1 führte bei TNF-α, IL-6 und IL-10 zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Frequenz positiv reagierender Donoren. Sowohl bei IFN-γ als auch bei IL-4 wurde die maximale Frequenz von 62,5 % bereits bei einer Substanzkonzentration von 10 µg/ml erreicht. IL-2 wurde ab einer ANC28.1-Konzentration von 1 µg/ml von 100 % der Donoren in Konzentrationen sezerniert, die über dem Schwellenwert lagen. Darüber hinaus zeigten TNF-α, IL-6 und IL-2 einen konzentrationsabhängigen Anstieg in ihren medianen Konzentrationen. Die Frequenz stieg bei TNF-α von 12,5 % (0,1 µg/ml ANC28.1) auf 100 % (100 µg/ml ANC28.1), die mediane Konzentration von 0,61 pg/ml auf 32,73 pg/ml. Bei IL-6 stieg die Frequenz von 0 % (0,1 µg/ml ANC28.1) auf 87,5 % (100 µg/ml ANC28.1), die mediane Konzentration von 0,27 pg/ml auf 484,82 pg/ml. IL-2 zeigte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der medianen Konzentration von 0,10 pg/ml (0,1 µg/ml) auf 117,57 pg/ml (100 µg/ml). Somit lagen die medianen IL-2-Konzentrationen nach Stimulation mit 10 µg/ml (88,90 pg/ml) und 100 µg/ml ANC28.1 (117,57 pg/ml) um ein 17,78-faches bzw. 23,51-faches über der medianen IL-2-Konzentration der Positivkontrolle (5,0 pg/ml). Bei IL-10 reagierten 12,5 – 100 % (0,1 µg/ml – 100 µg/ml ANC28.1) der Donoren positiv. Eine maximale Sekretion von 29,27 pg/ml wurde bereits bei einer Stimulation mit 10 µg/ml ANC28.1 erreicht und nahm bei 100 µg/ml auf 21,77 pg/ml ab. Sowohl bei IFN-γ als auch bei IL-4 kam es zu einem Anstieg der Frequenzen von 12,5 % bzw. 0 % (0,1 µg/ml ANC28.1) auf 62,5 % (ab 10 µg/ml). Bei beiden Zytokinen wurde eine maximale mediane Konzentration bei einer Substanzkonzentration von 10 µg/ml detektiert (IFN-γ: 838,02 pg/ml; IL-4: 14,75 pg/ml). Bei Erhöhung dieser Konzentration auf 100 µg/ml ANC28.1 nahmen die Zytokinkonzentrationen wieder ab (IFN-γ: 583,32 pg/ml; IL-4: 8,70 pg/ml). Hier überschritten die IL-4-Konzentrationen nach Stimulation der Zellen mit 10 µg/ml (14,75 pg/ml) und 100 µg/ml (8,70 pg/ml) die Konzentration in der Positivkontrolle (4,64 pg/ml) um ein 3,18- bzw. 1,88-faches. Bei allen

dargestellten Zytokinen wurde der größte Anstieg der medianen Konzentrationen nach Stimulation mit ANC28.1-Konzentrationen zwischen 1 µg/ml und 10 µg/ml verzeichnet.

Somit wurde mit einer maximalen ANC28.1-Konzentration von 100 µg/ml sowohl für TNF-α als auch für IL-10 ein prozentualer Anteil positiv reagierender Donoren erzielt, welcher dem der Positivkontrolle entspricht (100 %). Bei IL-2 wurde eine mit der Positivkontrolle vergleichbare Frequenz positiver Reaktionen bereits durch eine ANC28.1-Konzentration von 1 µg/ml erreicht (100 %). Die mediane IL-2-Konzentration nach Stimulation mit 10 µg/ml und 100 µg/ml ANC28.1 überschritt zudem die IL-2-Konzentration nach Stimulation mit der Positivkontrolle deutlich. Gleiche ANC28.1-Konzentrationen (10 µg/ml und 100 µg/ml) induzierten darüber hinaus IL-4-Sekretionen, deren Konzentrationen ebenfalls über denen der Positivkontrolle lagen. OKT3 induzierte lediglich bei maximaler Konzentration und nur im Fall von IL-10 Reaktionen, die der Positivkontrolle entsprachen. Hier lag der prozentuale Anteil positiver Reaktionen bei beiden Stimuli bei 100 %.

Aufgrund der erzielten Ergebnisse im Rahmen der Vollblut-Methode (Abb. 47) lässt sich festhalten, dass die einzelnen mAk sowohl die medianen Konzentrationen der sezernierten Zytokine als auch den prozentualen Anteil positiv reagierender Donoren unterschiedlich stark beeinflussen. Während Remicade durchschnittlich die schwächsten Reaktionen induzierte, hatte eine Stimulation mit ANC28.1 den größten Einfluss auf das Zytokinprofil, gefolgt von OKT3. Die MabThera-induzierten Reaktionen ließen sich im Mittelfeld der durch die verschiedenen mAk induzierten Reaktion einstufen.





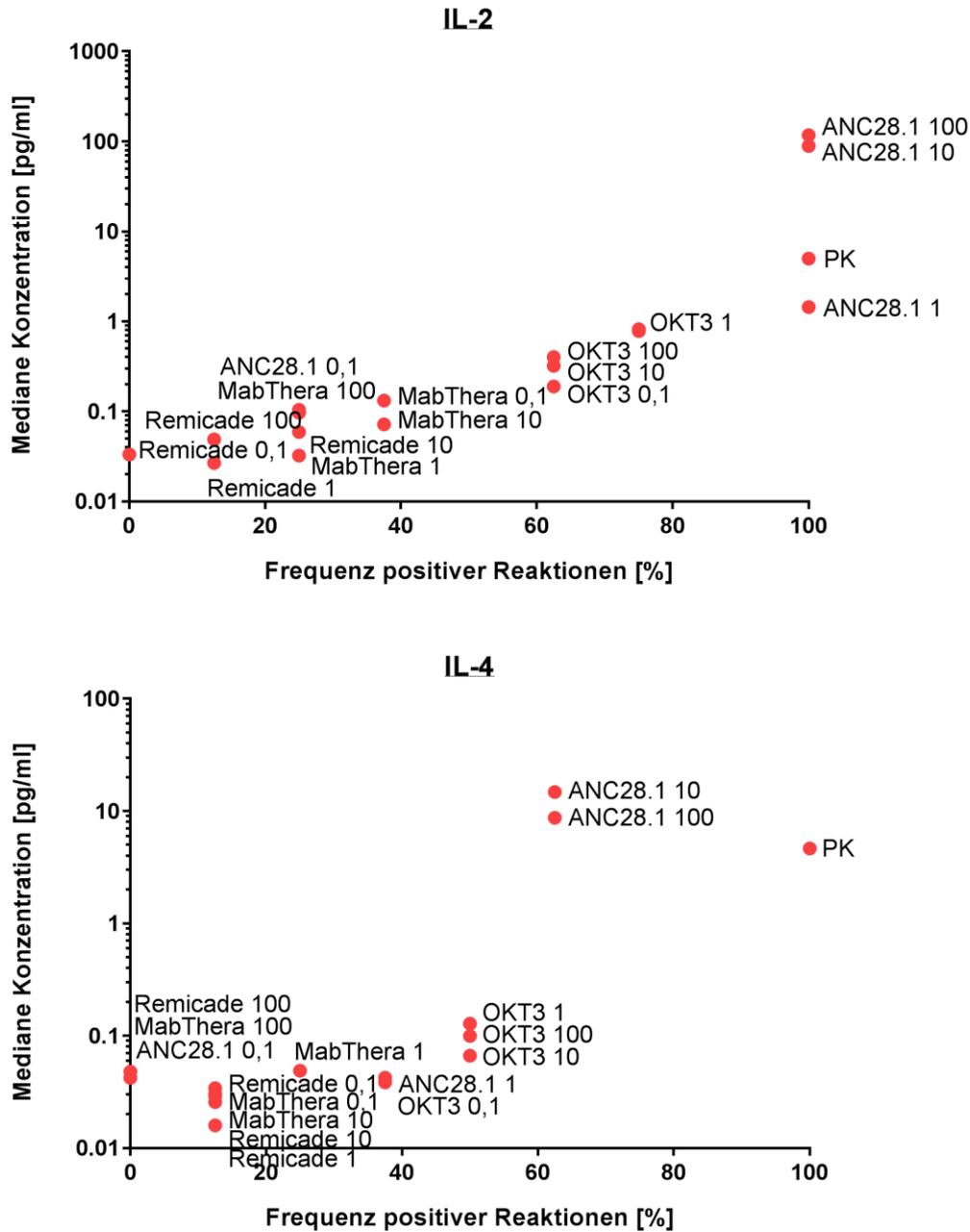


Abbildung 47: Frequenzen positiver Reaktionen und Konzentrationen sezernierter Zytokine im Vollblut nach *in vitro* Stimulation mit therapeutischen monoklonalen Antikörpern. Reaktionen einer Kohorte aus acht Donoren anhand der Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-2 und IL-4. Vollblut einzelner Donoren wurde *in vitro* für 24 Stunden mit Erbitux, Remicade, MabThera, OKT3 und ANC28.1 verschiedener Konzentrationen (0,1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$) und einer Positivkontrolle (PK: LPS [1 $\mu\text{g/ml}$] + PHA [5 $\mu\text{g/ml}$]) stimuliert. Die Bestimmung des Zytokingehalts in Plasmaüberständen erfolgte mittels MSD. Aus technischen Duplikaten wurde der arithmetische Mittelwert gebildet. Die Daten zeigen die medianen Zytokinsekretionen (pg/ml) aufgetragen gegen den prozentualen Anteil positiver *Responder* aller Donoren. Ein Schwellenwert wurde basierend auf dem 95. Perzentil der Reaktionen aller Donoren auf Erbitux festgelegt. Zytokinsekretionen über dem 95. Perzentil der Sekretionen bei korrespondierender Erbitux-Konzentration wurden als positiv erachtet.

PBMC-Methode

Im Rahmen der PBMC-Methode (Abb. 48) führte eine Stimulation der PBMCs mit der Positivkontrolle bei vier der sechs dargestellten Zytokine (TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4) zu einer Frequenz positiver Reaktionen von 100 %. Bei IFN- γ reagierten 80 %, bei IL-2 60 % der Donoren positiv. Zudem wurden bei TNF- α , IL-10 und IL-6 die höchsten Zytokinkonzentrationen, im Vergleich zu denen nach Stimulation mit den verschiedenen mAk, sezerniert.

Eine Stimulation mit Remicade induzierte konzentrationsunabhängige Reaktionen. Die Frequenz positiv reagierender Donoren für die Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-2 und IL-4 betrug ≤ 20 %. IL-10 wurde als Reaktion auf Remicade von bis zu 40 % der Donoren in Konzentrationen oberhalb des Erbitux-Schwellenwertes sezerniert. Im Vergleich zu den sezernierten TNF- α -Konzentrationen nach Stimulation mit den anderen mAk, wurden über die gesamte Konzentrationsspanne von Remicade hinweg die niedrigsten Konzentrationen dieses Zytokins detektiert ($\leq 5,2$ pg/ml). Auch die Konzentrationen der übrigen Zytokine siedelten sich mit $\leq 0,16$ pg/ml (IL-10, IL-4), $\leq 0,31$ pg/ml (IL-2), $\leq 1,48$ pg/ml (IFN- γ) und $\leq 5,77$ pg/ml (IL-6) im unteren Bereich der Konzentrationskala an.

MabThera zeigte, mit Ausnahme von TNF- α , bei keinem der dargestellten Zytokine konzentrationsabhängige Effekte, weder auf die Frequenz positiver Reaktionen noch auf die medianen Zytokinkonzentrationen. Die Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-6 wiesen bei maximaler Substanzkonzentration (100 μ g/ml) sowohl die für MabThera höchsten Frequenzen positiv reagierender Donoren als auch die höchsten sezernierten medianen Konzentrationen auf (IFN- γ : 60 %; 11,33 pg/ml; TNF- α : 60 %; 45,96 pg/ml; IL-6: 40 %; 11,59 pg/ml). Während bei geringeren MabThera-Konzentrationen (0,1 – 10 μ g/ml) 20 % der Donoren positiv mit IFN- γ - und IL-6-Sekretionen reagierten, zeigte sich bei TNF- α ab einer Konzentration von 1 μ g/ml ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Frequenzen von 20 % auf 60 %. Darüber hinaus wurde bei den medianen TNF- α -Konzentrationen ein konzentrationsabhängiger Anstieg über die gesamte Konzentrationsspanne von MabThera hinweg detektiert (6,59 pg/ml [0,1 μ g/ml] bis 45,96 pg/ml [100 μ g/ml]). IL-10 zeigte keine konzentrationsabhängigen Effekte und wurde in einem Konzentrationsbereich von $\leq 0,33$ pg/ml sezerniert. Bei niedrigster Substanzkonzentration (0,1 μ g/ml) ergab sich eine Frequenz von 80 % positiv reagierender Donoren, die ab einer Konzentration von 1 μ g/ml MabThera nur noch 40 % betrug. Eine IL-2-Sekretion wurde durch MabThera-Konzentrationen von 0,1 – 10 μ g/ml bei 40 % der Donoren in Konzentrationen oberhalb des Schwellenwertes induziert. Bei maximaler Konzentration (100 μ g/ml) reagierte kein Donor positiv. Die medianen IL-2-Konzentrationen lagen bei $\leq 0,41$ pg/ml. Eine positive Reaktion in Form einer IL-4-Sekretion zeigten ≤ 20 % der Donoren in einem Konzentrationsbereich von $\leq 0,07$ pg/ml.

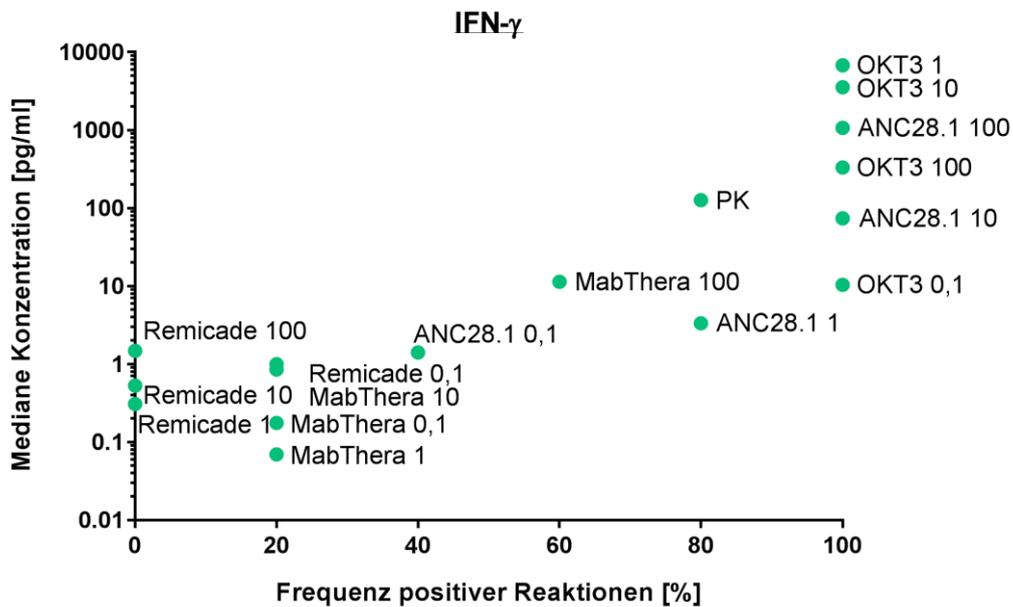
Der mAk OKT3 induzierte maximale Zytokinkonzentrationen bei Substanzkonzentrationen von 1 µg/ml (IFN-γ, IL-10, IL-2, IL-4) und 10 µg/ml (TNF-α und IL-6). Mit Ausnahme der Zytokine IFN-γ und TNF-α lagen die durch 1 µg/ml und 10 µg/ml induzierten medianen Zytokinkonzentrationen, verglichen mit denen der übrigen OKT3-Konzentrationen, recht nah beieinander (IL-10: ± 1,6 pg/ml; IL-2: ± 5,09 pg/ml; IL-4: ± 0,26 pg/ml; IL-6: ± 7,91 pg/ml). Bei IFN-γ lag die Frequenz positiver Reaktionen mit 100 % über die ganze OKT3-Konzentrationsspanne hinweg über der Frequenz, welche durch die Positivkontrolle induziert wurde (80 %). Die medianen IFN-γ-Konzentrationen überstiegen bei OKT3-Konzentrationen ab 1 µg/ml die Konzentration, die nach Stimulation mit der Positivkontrolle von den PBMCs sezerniert wurde (126,57 pg/ml). Eine maximale Induktion um das 53,50-fache der Positivkontrolle wurde mit einer OKT3-Konzentration von 1 µg/ml erreicht (6771,26 pg/ml). Für TNF-α betrug der prozentuale Anteil positiver Reaktionen bei niedrigster OKT3-Konzentration (0,1 µg/ml) 80 % und stieg ab einer Substanzkonzentration von 1 µg/ml auf 100 % an. Dies entsprach somit dem prozentualen Anteil positiver Reaktionen nach Stimulation mit der Positivkontrolle (100 %). Die mediane TNF-α-Konzentration erhöhte sich mit zunehmender OKT3-Konzentration bis 10 µg/ml von 26,82 pg/ml auf ein Maximum von 1485,76 pg/ml. Bei maximaler OKT3-Konzentration (100 µg/ml) wurden 810,10 pg/ml TNF-α detektiert. Insgesamt waren die medianen TNF-α-Konzentrationen im Vergleich zur Positivkontrolle um ein 1,1- bis 2-faches niedriger. Der prozentuale Anteil positiv reagierender Donoren verhielt sich bei IL-2 entsprechend dem bei TNF-α: Bei niedrigster Substanzkonzentration (0,1 µg/ml) betrug dieser 80 % und stieg ab einer OKT3-Konzentration von 1 µg/ml auf 100 % an. Anders als bei TNF-α, überschritten hier jedoch alle prozentualen Anteile den Anteil positiver Reaktionen der Positivkontrolle (60 %). Die medianen IL-2-Konzentrationen lagen über die gesamte OKT3-Konzentrationsspanne hinweg oberhalb der IL-2-Sekretion, die durch die Positivkontrolle induziert wurde (2,07 pg/ml). Eine maximale IL-2-Induktion um das 70,29-fache der Positivkontrolle wurde bei einer Stimulation mit einer OKT3-Konzentration von 1 µg/ml erreicht (145,49 pg/ml). Beim Zytokin IL-10 induzierte OKT3, unabhängig von der eingesetzten Konzentration, Frequenzen positiv reagierender Donoren von 100 %, was auch hier der Frequenz entsprach, die durch die Positivkontrolle generiert wurde. Die medianen IL-10-Konzentrationen lagen allesamt unterhalb der Positivkontrolle-induzierten IL-10 Konzentration. Eine maximale IL-10-Konzentration von 26,17 pg/ml wurde bei einer OKT3-Konzentration von 10 µg/ml detektiert. Diese war somit 1,8-fach niedriger als nach Stimulation mit der Positivkontrolle. Bei IL-6 und IL-4 befanden sich die prozentualen Anteile positiver Reaktionen auf OKT3 unterhalb der Frequenzen, welche durch die Positivkontrolle induziert wurden. IL-6 zeigte, unabhängig von der OKT3-Konzentration, Frequenzen positiver Reaktionen von 80 %, während die Frequenzen bei IL-4 von 40 % (0,1 µg/ml) auf 80 % stiegen (1 – 100 µg/ml). Eine OKT3-Stimulation der PBMCs mit Konzentrationen bis 10 µg/ml resultierte bei IL-6 in einem

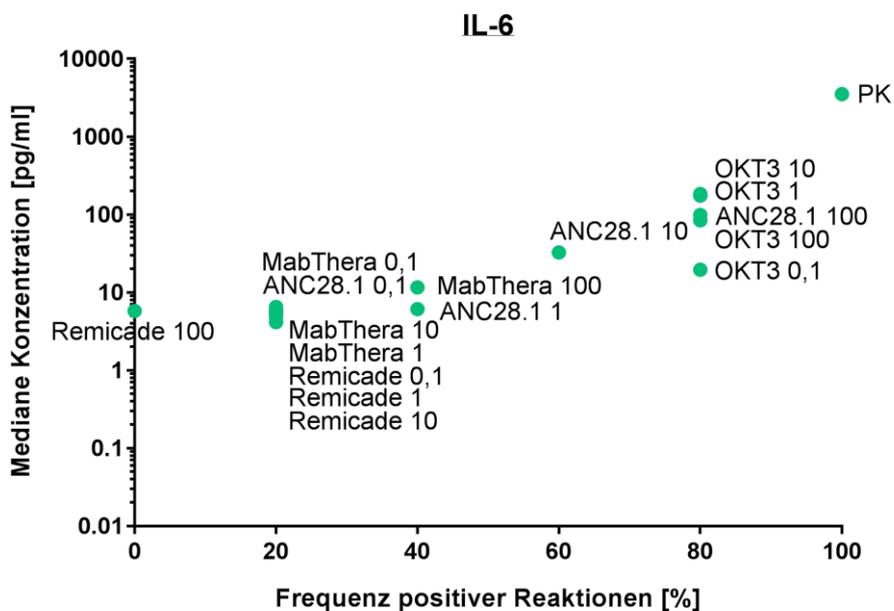
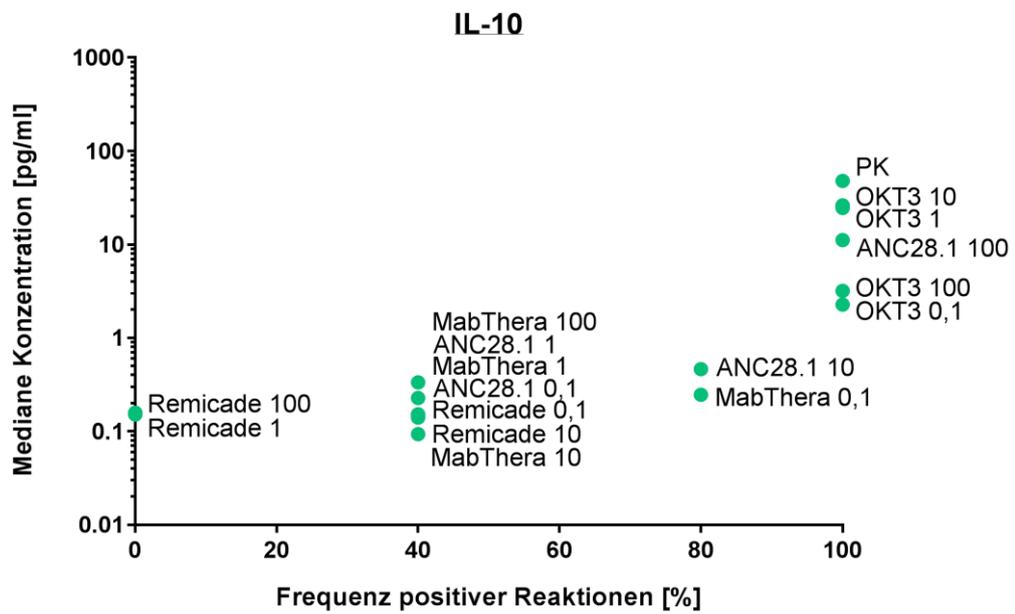
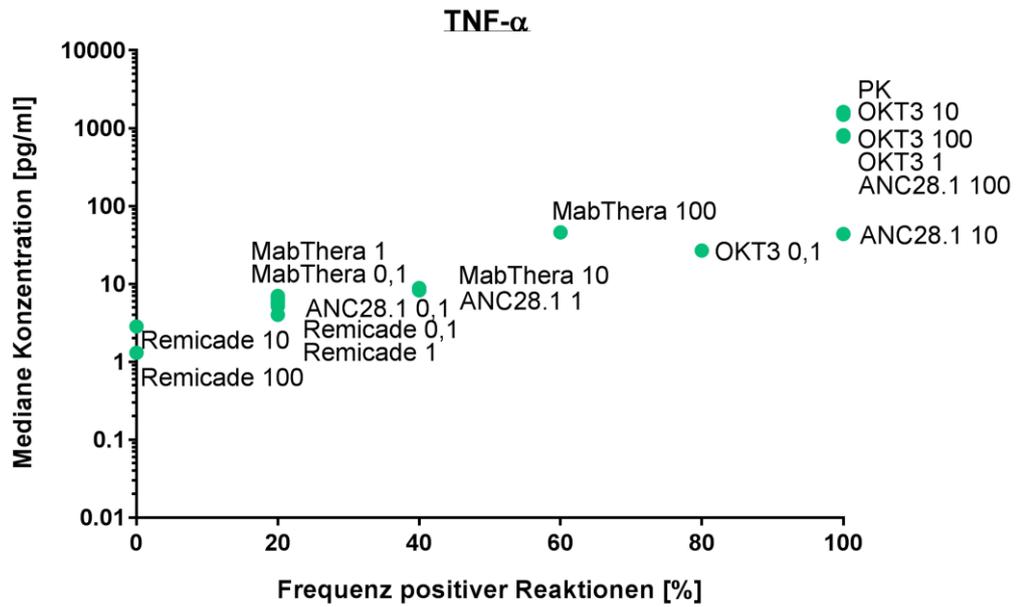
konzentrationsabhängigen Anstieg (von 19,56 pg/ml auf 182,92 pg/ml) und nahm bei 100 µg/ml OKT3 wieder auf 84,34 pg/ml ab. IL-4 zeigte konzentrationsunabhängig induzierte Sekretionen ≤ 1,08 pg/ml, wobei der maximal induzierte IL-4-Gehalt von 1,08 pg/ml nach Stimulation mit 1 µg/ml OKT3 den durch die Positivkontrolle induzierten Gehalt um das 1,11-fache überschritt.

Eine Stimulation der PBMCs mit ANC28.1 induzierte bei allen dargestellten Zytokinen (IFN-γ, TNF-α, IL-10, IL-6, IL-2 und IL-4) einen konzentrationsabhängigen Anstieg der medianen Konzentrationen. Auch der Anstieg der Frequenzen positiver Reaktionen zeigte konzentrationsabhängige Tendenzen. Sowohl IFN-γ als auch TNF-α zeigten nach ANC28.1-Stimulation einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Frequenzen positiv reagierender Donoren (IFN-γ: von 40 % auf 100 %; TNF-α: von 20 % auf 100 %). In beiden Fällen wurde das Maximum von 100 % bereits ab einer ANC28.1-Konzentration von 10 µg/ml erreicht. Bei IFN-γ lagen diese 100 % über der durch die Positivkontrolle induzierten Frequenz (80 %), während sie bei TNF-α der Positivkontrolle entsprachen. Bereits eine Stimulation der PBMCs mit 1 µg/ml ANC28.1 induzierte bei IFN-γ eine Frequenz positiver Reaktionen, die der durch die Positivkontrolle entsprach (80 %). Darüber hinaus konnte eine konzentrationsabhängige Verstärkung der Reaktionen bis zur maximalen ANC28.1-Konzentration von 100 µg/ml anhand der medianen Zytokinkonzentrationen herausgestellt werden. IFN-γ stieg von 1,41 pg/ml (0,1 µg/ml) auf 1073,27 pg/ml (100 µg/ml) an. Hier lag erst die mediane IFN-γ-Konzentration nach Stimulation der PBMCs mit maximaler ANC28.1-Konzentration ein 8,48-faches über der Positivkontrolle-induzierten IFN-γ-Konzentration (126,57 pg/ml). Die sezernierte mediane TNF-α-Konzentration stieg konzentrationsabhängig von 5,68 pg/ml (0,1 µg/ml) auf 777,36 pg/ml (100 µg/ml) und überschritt den Wert der Positivkontrolle (1619,93 pg/ml) nicht. Sowohl bei IL-10 als auch bei IL-4 wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Frequenzen von 40 % (0,1 µg/ml) auf 100 % (100 µg/ml) ab einer ANC28.1-Konzentration von 1 µg/ml detektiert. Somit lagen die Frequenzen, die durch eine maximale ANC28.1-Konzentration induziert wurden, im Fall beider Zytokine mit 100 % auf Höhe der Positivkontrolle. Die Resultate dieser Stimulationen (100 µg/ml ANC28.1; Positivkontrolle) unterschieden sich jedoch in ihren medianen Zytokinkonzentrationen. Die nach ANC28.1-Stimulation induzierte maximale, mediane IL-10-Konzentration (11,15 pg/ml) lag um das 4,28-fache unter der Positivkontrolle-induzierten Konzentration (47,77 pg/ml). Die maximal induzierte mediane IL-4-Konzentration (2,59 pg/ml) hingegen überschritt die durch die Positivkontrolle induzierte IL-4-Sekretion um das 2,67-fache. Beim Zytokin IL-6 konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg positiv reagierender Donoren von 20 % (0,1 µg/ml) auf 80 % (100 µg/ml) und der medianen IL-6-Konzentration von 6,08 pg/ml auf 98,43 pg/ml verzeichnet werden. ANC28.1 induzierte hier keine Reaktionen im Bereich der Positivkontrolle (100 %; 3530,75 pg/ml). IL-2 zeigte bei niedrigster ANC28.1-Konzentration eine Frequenz positiver Reaktionen von 60 %, welche der Positivkontrolle-induzierten Frequenz entsprach. Ab einer Konzentration von 1 µg/ml erreichte diese Frequenz

100 % und lag somit über der induzierten Frequenz durch die Positivkontrolle. Die medianen IL-2-Konzentrationen stiegen konzentrationsabhängig von 2,12 pg/ml (0,1 µg/ml) auf 1017,18 pg/ml (100 µg/ml) an und lagen hiermit über der Konzentration nach Stimulation mit der Positivkontrolle (2,07 pg/ml). Die maximale IL-2-Induktion durch ANC28.1 betrug folglich das 491,39-fache der Positivkontrolle.

Bei Betrachtung der Ergebnisse im Rahmen der PBMC-Methode (Abb. 48) lässt sich zusammenfassen, dass die einzelnen mAk sowohl die medianen Konzentrationen der sezernierten Zytokine als auch den prozentualen Anteil positiv reagierender Donoren unterschiedlich stark beeinflussen. Remicade hatte durchschnittlich den schwächsten Einfluss auf das Zytokinprofil der PBMCs, gefolgt von MabThera. OKT3 und ANC28.1 hingegen stellten die potentesten Stimuli dar und induzierten Reaktionen, die oftmals im Bereich der Positivkontrolle-induzierten Reaktionen lagen oder diese sogar überschritten. Hierbei induzierte OKT3 in niedrigeren Konzentrationen (0,1 – 10 µg/ml) höhere Induktionen, im Vergleich zu den korrespondierenden Konzentrationen ANC28.1.





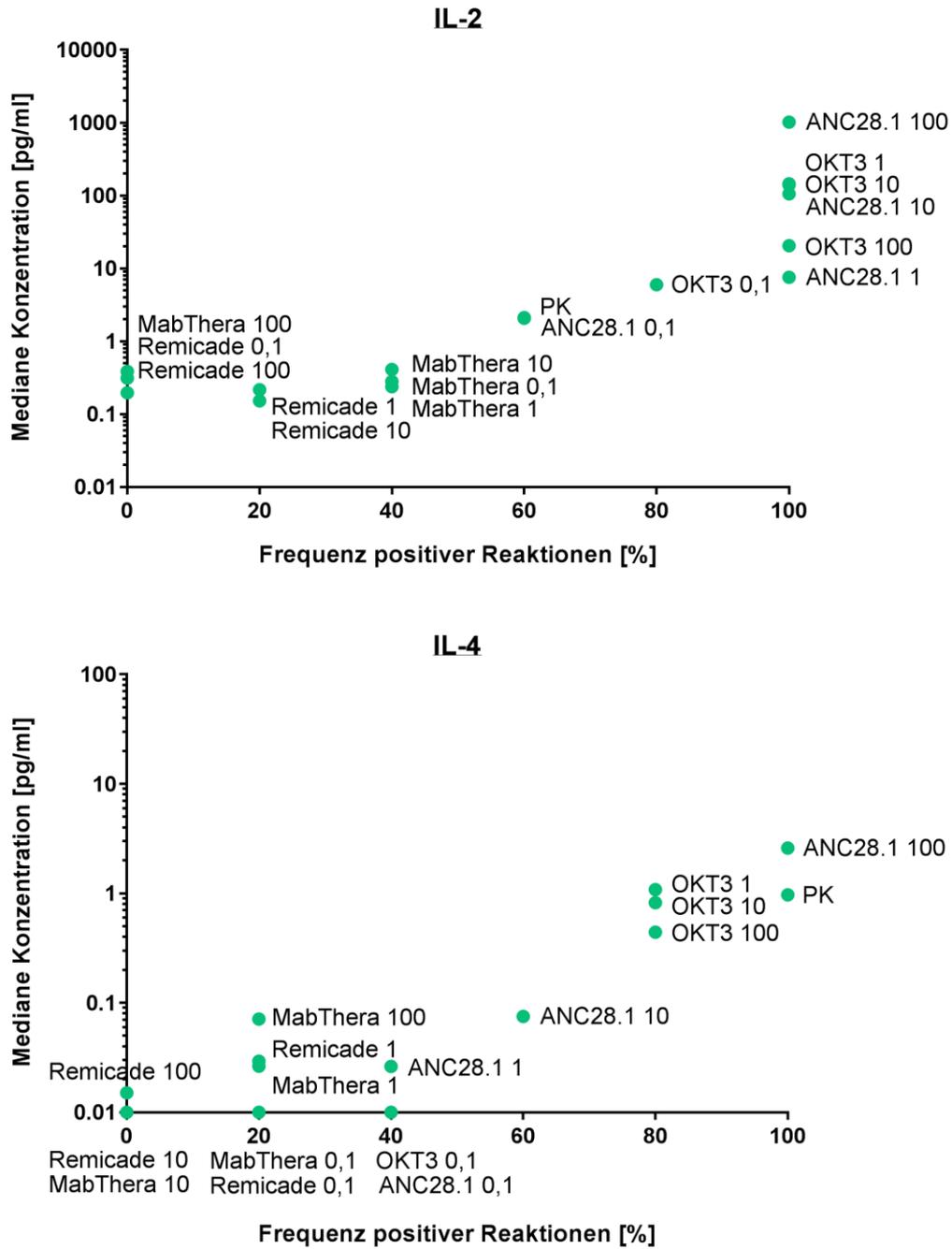


Abbildung 48: Frequenzen positiver Reaktionen und Konzentrationen sezernierter Zytokine nach *in vitro* Stimulation von aufgereinigten PBMCs mit therapeutischen monoklonalen Antikörpern. Reaktionen einer Kohorte aus fünf Donoren anhand der Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-2 und IL-4. Wells wurden \ddot{u} .N. mit Erbitux, Remicade, MabThera, OKT3 und ANC28.1 verschiedener Konzentrationen (0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml) und einer Positivkontrolle (PK: LPS [1 μ g/ml] + PHA [5 μ g/ml]) beschichtet. Mittels Biocoll-Dichtegradientenzentrifugation wurden PBMCs aus Vollblut einzelner Donoren isoliert und f \ddot{u} r 24 Stunden in den beschichteten Wells kultiviert (8×10^5 PBMCs/ml). Die Bestimmung des Zytokingehalts in Zellkultur \ddot{u} berst \ddot{a} nden erfolgte mittels MSD. Aus technischen Duplikaten wurde der arithmetische Mittelwert gebildet. Die Daten zeigen die medianen Zytokingehalte, aufgetragen gegen den prozentualen Anteil positiver *Responder* aller Donoren. Ein Schwellenwert wurde basierend auf dem 95. Perzentil der Reaktionen aller Donoren auf Erbitux festgelegt. Zytokinsekretionen \ddot{u} ber dem 95. Perzentil der Sekretionen bei korrespondierender Erbitux-Konzentration wurden als positiv erachtet.

Um trotz der immensen Menge an Zytokindaten einen Überblick über die durch die einzelnen mAk induzierten Reaktionen zu erhalten, erwies sich eine Darstellung in Form einer *Heatmap* als geeignet (Abb. 49A, Abb. 50A). Die aus der *Heatmap* resultierenden Dendrogramme basieren auf den induzierten Sezernierungsprofilen und ordnen die einzelnen mAk in Gruppen vergleichbarer Zytokinmuster und Induktionsstärken ein. Diese Daten ließen sich mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*; PCA) weiter zusammenfassen (Abb. 49B, Abb. 50B). Indem diese Analyse auf eine Darstellung der Daten einzelner Zytokine verzichtet, wurde der Einfluss der unterschiedlichen mAk auf die Gesamtheit aller analysierten Zytokine deutlich.

Das aus der *Heatmap* des Vollblut-CRAs resultierende Dendrogramm zeigte zwei Hauptzweige (Abb. 49A):

Der erste Hauptzweig beinhaltete ANC28.1 in den Konzentrationen 10 µg/ml und 100 µg/ml, die ein identisches Zytokinmuster induzierten (siehe Farbskalierung). Zusammengefasst mit der höchsten OKT3-Konzentration (100 µg/ml) und der Positivkontrolle induzierte diese Gruppe das stärkste Zytokinprofil, sowohl in der Anzahl als auch in der Konzentration der induzierten Zytokine.

Der zweite Hauptzweig beinhaltete die übrigen mAk in ihren verschiedenen Konzentrationen, welche erneut mehrfach gruppiert wurden.

Erbitux und Remicade zeigten in allen Konzentrationen ein ähnlich schwaches Zytokinmuster. Sie bildeten gemeinsam mit der niedrigsten ANC28.1-Konzentration (0,1 µg/ml) eine Untergruppe im zweiten Hauptzweig, wobei sich Remicade in den beiden höchsten Konzentrationen (10 µg/ml und 100 µg/ml) nochmals von der restlichen Gruppe abzweigte.

Eine weitere Untergruppe im zweiten Hauptzweig bildeten MabThera (0,1 – 100 µg/ml), OKT3 (0,1 – 10 µg/ml) und ANC28.1 (1 µg/ml). Diese Untergruppe unterschied sich überwiegend durch die Induktion der Zytokine IFN-γ und IL-1β von der Vorherigen. Innerhalb dieser Untergruppe grenzte sich ANC28.1 (1 µg/ml) mit dem schwächsten Sezernierungsprofil nochmals von MabThera und OKT3 ab. Während das induzierte Zytokinmuster der niedrigsten OKT3-Konzentration mit dem der höchsten MabThera-Konzentration die meisten Übereinstimmungen hatte und zusammen mit den übrigen Konzentrationen von MabThera gruppiert wurde, unterschieden sich die restlichen OKT3-Konzentrationen (1 µg/ml und 10 µg/ml) hiervon nochmal.

Die PCA fasst diese Ergebnisse der Vollblut-Methode weiter zusammen, ohne die Muster nach den einzelnen Zytokinen aufzuschlüsseln (Abb. 49B). Hier zeigte sich erneut, dass sich ANC28.1 in den Konzentrationen 10 – 100 µg/ml und OKT3 in maximaler Konzentration (100 µg/ml) zusammen mit der Positivkontrolle am stärksten von den anderen Datenpunkten abhoben und demzufolge die stärksten Effekte auf das induzierte Zytokinprofil der Zellen im

Vollblut ausübten. Darüber hinaus bildeten alle Konzentrationen von Erbitux und Remicade ein Cluster mit den schwächsten Reaktionen. Hiervon separierte sich wiederum minimal das Cluster, welches von MabThera gebildet wurde.

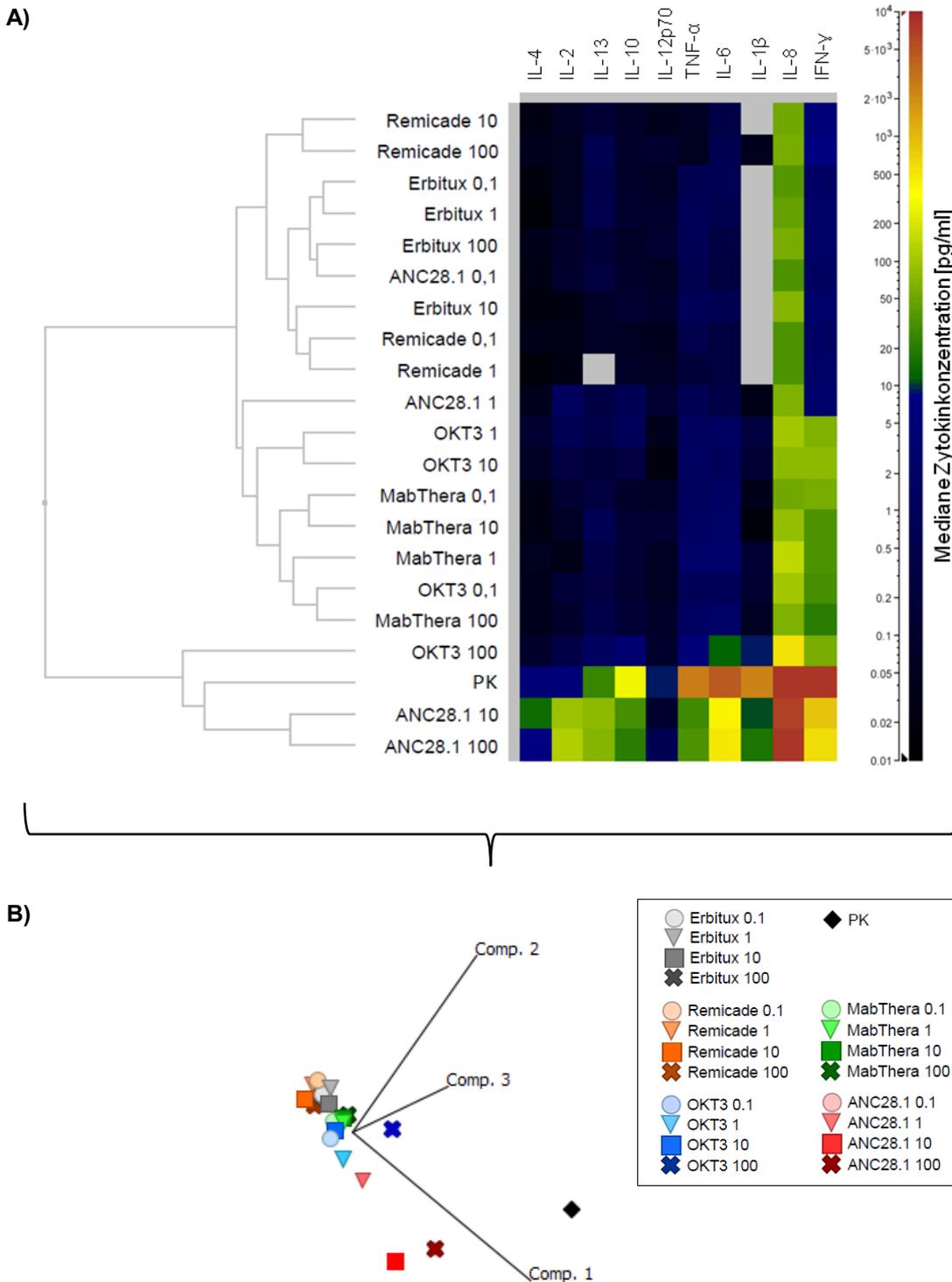


Abbildung 49: Analyse der induzierten Reaktionen im Vollblut auf die *in vitro* Stimulation mit therapeutischen monoklonalen Antikörpern. A) Die *Heatmap* zeigt das induzierte Zytokinmuster nach 24-stündiger *in vitro* Stimulation von Vollblut. Die Färbung gibt die mediane Konzentration (pg/ml) der einzelnen Zytokine (waagrecht) von acht Donoren (n=8) bei Stimulation mit mAk (Erbitux, Remicade, MabThera, OKT3 und ANC28.1) verschiedener Konzentrationen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml) (senkrecht) entsprechend der Farbskala an. Die aus den

Sezernierungsprofilen entstehenden zweidimensionalen hierarchischen Clusterungen sind als Dendrogramm dargestellt. B) Die Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*; PCA) zeigt den Einfluss der unterschiedlichen Stimulationen auf die Gesamtheit der Zytokine aller untersuchter Donoren. Die PCA aller acht Donoren (n=8) wurde basierend auf den Datensätzen aller untersuchten Zytokine (IFN- γ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α) durchgeführt.

Das aus der *Heatmap* resultierende Dendrogramm gliederte sich auch bei den Ergebnissen des PBMC-CRAs zunächst in zwei Hauptzweige auf (Abb. 50A):

Die erste Hauptgruppe beinhaltete ANC28.1 in den Konzentrationen 10 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$, OKT3 (1 – 100 $\mu\text{g/ml}$) sowie die Positivkontrolle. Zusammengefasst induzierte diese Gruppe das stärkste Zytokinprofil, sowohl in der Anzahl als auch in der Konzentration der induzierten Zytokine. Innerhalb dieser Gruppe unterschieden sich insbesondere die Zytokinprofile der höchsten OKT3-Konzentration und der 10 $\mu\text{g/ml}$ ANC28.1 von denen der übrigen mAk. Anhand der *Heatmap* wird ersichtlich, dass der wesentliche Grund für diese Unterschiede ausbleibende IL-10- und IL-13-Sekretionen waren.

Der zweite Hauptzweig wurde von den übrigen ANC28.1-Konzentrationen (0,1 – 1 $\mu\text{g/ml}$), der niedrigsten OKT3-Konzentration (0,1 $\mu\text{g/ml}$) und allen Konzentrationen (0,1 – 100 $\mu\text{g/ml}$) von MabThera, Remicade und Erbitux gebildet. Auch hier erfolgte eine weitere hierarchische Zerlegung.

Alle im zweiten Hauptzweig vorkommenden ANC28.1-Konzentrationen wiesen ein ähnliches Zytokinmuster zur niedrigsten (0,1 $\mu\text{g/ml}$) OKT3- und höchsten (100 $\mu\text{g/ml}$) MabThera-Konzentration auf und bildeten somit eine erste Untergruppe.

Die schwächsten Zytokinprofile zeigten die mAk der zweiten Untergruppe, welche aus den übrigen Konzentrationen von MabThera (0,1 – 10 $\mu\text{g/ml}$) und allen getesteten Konzentrationen von Remicade und Erbitux gebildet wurde (0,1 – 100 $\mu\text{g/ml}$).

Auch im Rahmen der PBMC-Methode wurden die Ergebnisse nochmals durch die PCA vereinfacht zusammengefasst (Abb. 50B). Erbitux, Remicade und MabThera (0,1 – 10 $\mu\text{g/ml}$) bildeten ein negatives Cluster, von dem sich OKT3 und ANC28.1 abhoben. Die Datenpunkte für ANC28.1 separierten sich zudem konzentrationsabhängig vom negativen Cluster. OKT3 hatte in den Konzentrationen 1 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ den größten Einfluss auf die Gesamtheit der induzierten Zytokine. Auch MabThera induzierte in maximaler Konzentration (100 $\mu\text{g/ml}$) ein Sezernierungsprofil, das sich geringfügig vom negativen Cluster abhob.

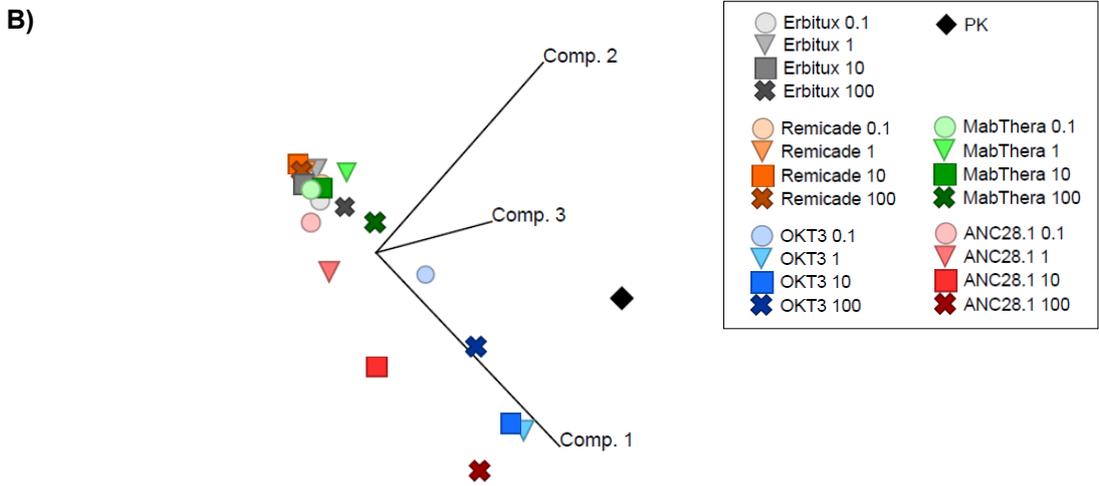
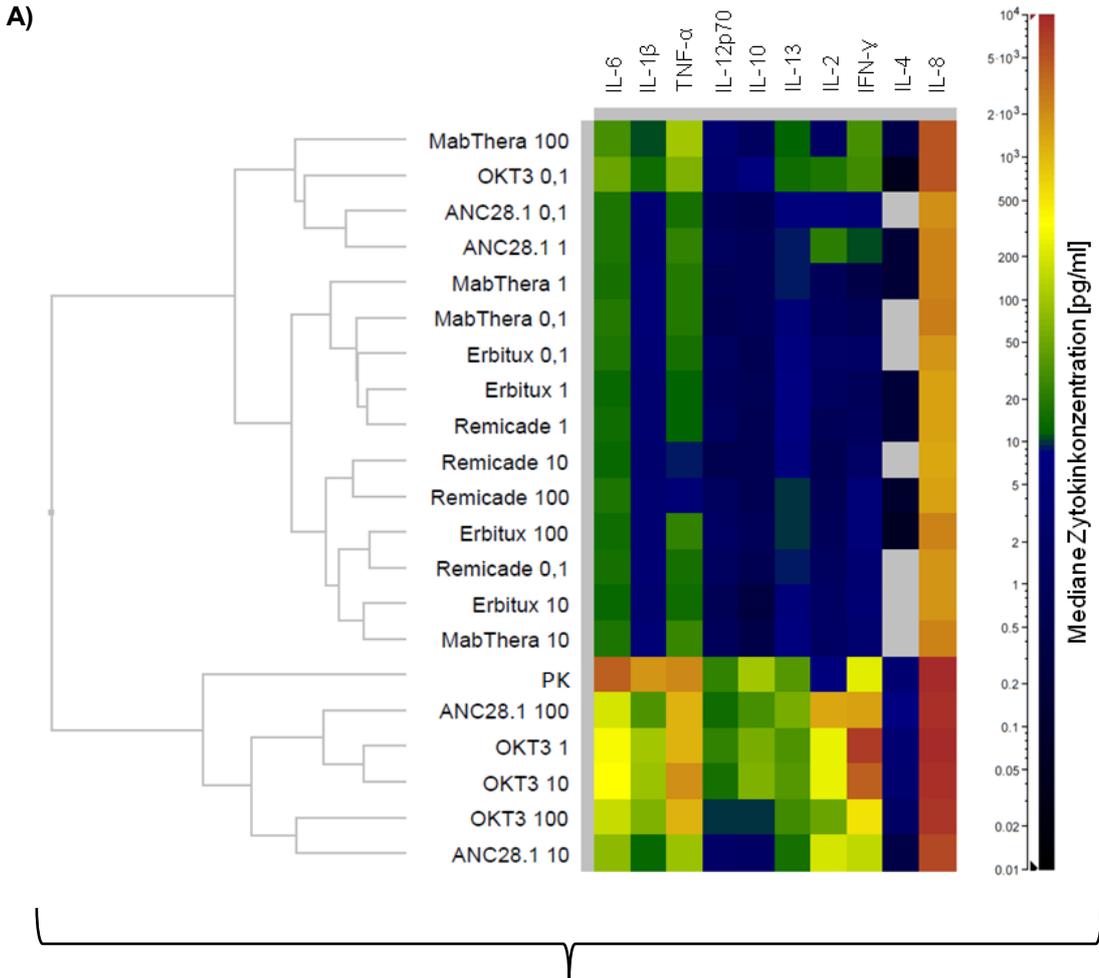


Abbildung 50: Analyse der induzierten Reaktionen von aufgereinigten PBMCs auf die *in vitro* Stimulation mit therapeutischen monoklonalen Antikörpern. A) Die *Heatmap* zeigt das induzierte Zytokinmuster nach 24-stündiger *in vitro* Stimulation von PBMCs. Die Färbung gibt die mediane Konzentration (pg/ml) der einzelnen Zytokine (waagrecht) von fünf Donoren (n=5) bei Stimulation mit mAk (Erbitux, Remicade, MabThera, OKT3 und ANC28.1) verschiedener Konzentrationen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml) (senkrecht) entsprechend der Farbskala an. Die aus den Sezernierungsprofilen entstehenden zweidimensionalen hierarchischen Clusterungen sind als Dendrogramm dargestellt. B) Die Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*; PCA) zeigt den Einfluss der unterschiedlichen Stimulationen auf die Gesamtheit der Zytokine aller untersuchter Donoren. Die PCA aller fünf Donoren (n=5) wurde basierend auf den Datensätzen aller untersuchten Zytokine (IFN-γ, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α) durchgeführt.

Um Aussagen darüber treffen zu können, welche Methode zur Detektion eines potenziellen Zytokinsturms am geeignetsten erscheint, werden im Folgenden die absoluten Zytokinkonzentrationen beider Methoden miteinander verglichen (Abb. 51). Repräsentativ sind die Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2, nach Stimulation der Zellen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ (Abb. 51A) und 100 $\mu\text{g/ml}$ (Abb. 51B) der mAk, dargestellt. Es wird auch Bezug auf die übrigen analysierten Zytokine (IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-1 β , IL-4, IL-6 und IL-8) genommen, welcher sich im Folgenden immer auf die Konzentrationen 1 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$ der mAk bezieht.

Erbix induzierte bei keinem der analysierten Zytokine signifikante Unterschiede zwischen den Methoden. Während die mediane IFN- γ -Konzentration im Rahmen der Vollblut-Methode im Vergleich zur PBMC-Methode höher ausfiel (1 $\mu\text{g/ml}$: 3,11 pg/ml vs. 0,23 pg/ml; 100 $\mu\text{g/ml}$: 3,15 pg/ml vs. 1,55 pg/ml), wurde eine höhere TNF- α - und IL-2-Freisetzung durch PBMCs detektiert.

Eine Stimulation der Zellen mit MabThera ergab, mit Ausnahme von IL-8, keine signifikanten Unterschiede in den medianen Konzentrationen der analysierten Zytokine zwischen den Methoden. Dennoch war der mediane IFN- γ -Gehalt bei der Vollblut-Methode im Vergleich zur PBMC-Methode höher (1 $\mu\text{g/ml}$: 131,27 pg/ml vs. 0,07 pg/ml; 100 $\mu\text{g/ml}$: 99,83 pg/ml vs. 11,33 pg/ml). TNF- α hingegen wurde in höherem Ausmaß von PBMCs sezerniert, insbesondere bei einer MabThera-Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ (45,96 pg/ml vs. 2,01 pg/ml). Im Vergleich zur Verwendung von Vollblut lag die mediane TNF- α -Konzentration hier ein 22,87-faches höher. Bei IL-2 ließen sich Unterschiede in den medianen Zytokinkonzentrationen zugunsten der PBMC-Methode erkennen, welche allerdings im unteren Bereich der Konzentrationskala lagen (< 0,4 pg/ml). Lediglich bei IL-8 war die mediane Freisetzung durch PBMCs signifikant höher (* $p < 0,05$) gegenüber der Freisetzung durch die Zellen des Vollblutes (Daten nicht gezeigt).

OKT3 induzierte im Rahmen der PBMC-Methode höhere mediane Zytokinkonzentrationen im Vergleich zur Vollblut-Methode. IFN- γ zeigte bei Stimulation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ eine signifikant höhere Sekretion durch PBMCs als durch die Zellen des Vollblutes (30,51-fache Induktion: 6771,26 pg/ml vs. 221,93 pg/ml). Eine Stimulation mit 100 $\mu\text{g/ml}$ OKT3 ergab eine nicht signifikante Induktion um das 1,37-fache (331,5 pg/ml vs. 242,73 pg/ml). Die PBMC-Methode führte darüber hinaus zu einer signifikanten Erhöhung der medianen TNF- α -Freisetzung von 9,56 pg/ml auf 796,62 pg/ml (1 $\mu\text{g/ml}$ OKT3) bzw. von 2,90 pg/ml auf 810,10 pg/ml (100 $\mu\text{g/ml}$ OKT3) im Vergleich zur Vollblut-Methode. Das Zytokin IL-2 wurde ebenfalls vermehrt von PBMCs sezerniert (1 $\mu\text{g/ml}$: 145,49 pg/ml vs. 2,32 pg/ml; 100 $\mu\text{g/ml}$: 20,55 pg/ml vs. 0,99 pg/ml). Auch bei allen zusätzlich analysierten Zytokinen (Daten nicht gezeigt) war ihre Sekretion durch PBMCs im Vergleich zur Vollblut-Methode erhöht, sowohl nach Stimulation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ als auch nach Stimulation mit 100 $\mu\text{g/ml}$ OKT3. Im Fall der Zytokine IL-10, IL-12p70, IL-1 β und IL-8 war diese Induktion bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ OKT3 signifikant (IL-10:

* $p < 0,05$; IL-12p70 und IL-1 β : **** $p < 0,0001$; IL-8: ** $p < 0,01$). Die maximale OKT3-Konzentration wirkte sich wiederum auf die Sekretion der Zytokine IL-12p70 und IL-8 signifikant aus (** $p < 0,01$).

Eine Stimulation mit ANC28.1 induzierte sowohl bei 1 $\mu\text{g/ml}$ als auch bei 100 $\mu\text{g/ml}$ eine erhöhte IFN- γ -Sekretion durch die Zellen des Vollblutes. Diese lag das 3,62- (12,09 pg/ml vs. 3,34 pg/ml) bzw. 3,06-fache (3284,74 pg/ml vs. 1073,27 pg/ml) über der IFN- γ -Sekretion durch PBMCs. TNF- α und IL-2 hingegen wurden im Fall beider ANC28.1-Konzentrationen vermehrt von PBMCs freigesetzt. Diese erhöhte Freisetzung war bei maximaler ANC28.1-Konzentration signifikant. Vergleichend zur Sekretion durch die Zellen im Vollblut wurde TNF- α um den Faktor 10,42 (1 $\mu\text{g/ml}$ ANC28.1) bzw. 10,24 (100 $\mu\text{g/ml}$ ANC28.1) und IL-2 um den Faktor 4,03 (1 $\mu\text{g/ml}$ ANC28.1) bzw. 5,80 (100 $\mu\text{g/ml}$ ANC28.1) vermehrt freigesetzt. Unter den weiteren analysierten Zytokinen wurde auch IL-12p70, unabhängig von der ANC28.1-Konzentration, vermehrt von PBMCs sezerniert. Diese gesteigerte Sekretion war nach Stimulation mit 100 $\mu\text{g/ml}$ ANC28.1 signifikant gegenüber der Sekretion im Vollblut (** $p < 0,01$). Die IL-8-Freisetzungen ließen bei 1 $\mu\text{g/ml}$ ANC28.1 einen Unterschied zwischen beiden Methoden zugunsten der PBMC-Methode erkennen, während bei 100 $\mu\text{g/ml}$ ANC28.1 kaum noch Unterschiede in den medianen IL-8-Konzentrationen erkennbar waren. IL-1 β , IL-6 und IL-13 wurden nach Stimulation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ ANC28.1 ebenfalls in höheren Konzentrationen von PBMCs freigesetzt. Die maximale ANC28.1-Konzentration hingegen führte bei den Zellen des Vollblutes zu erhöhten Sekretionen dieser Zytokine im Vergleich zu PBMCs. Die gesteigerten Sekretionen waren sowohl bei IL-6 als auch bei IL-13 signifikant (**** $p < 0,0001$). Auch die Zytokine IL-4 und IL-10 wurden im Vollblut in höheren Konzentrationen sezerniert als von PBMCs. Bei maximaler ANC28.1-Konzentration waren diese signifikant (IL-4: * $p < 0,05$; IL-10: ** $p < 0,01$).

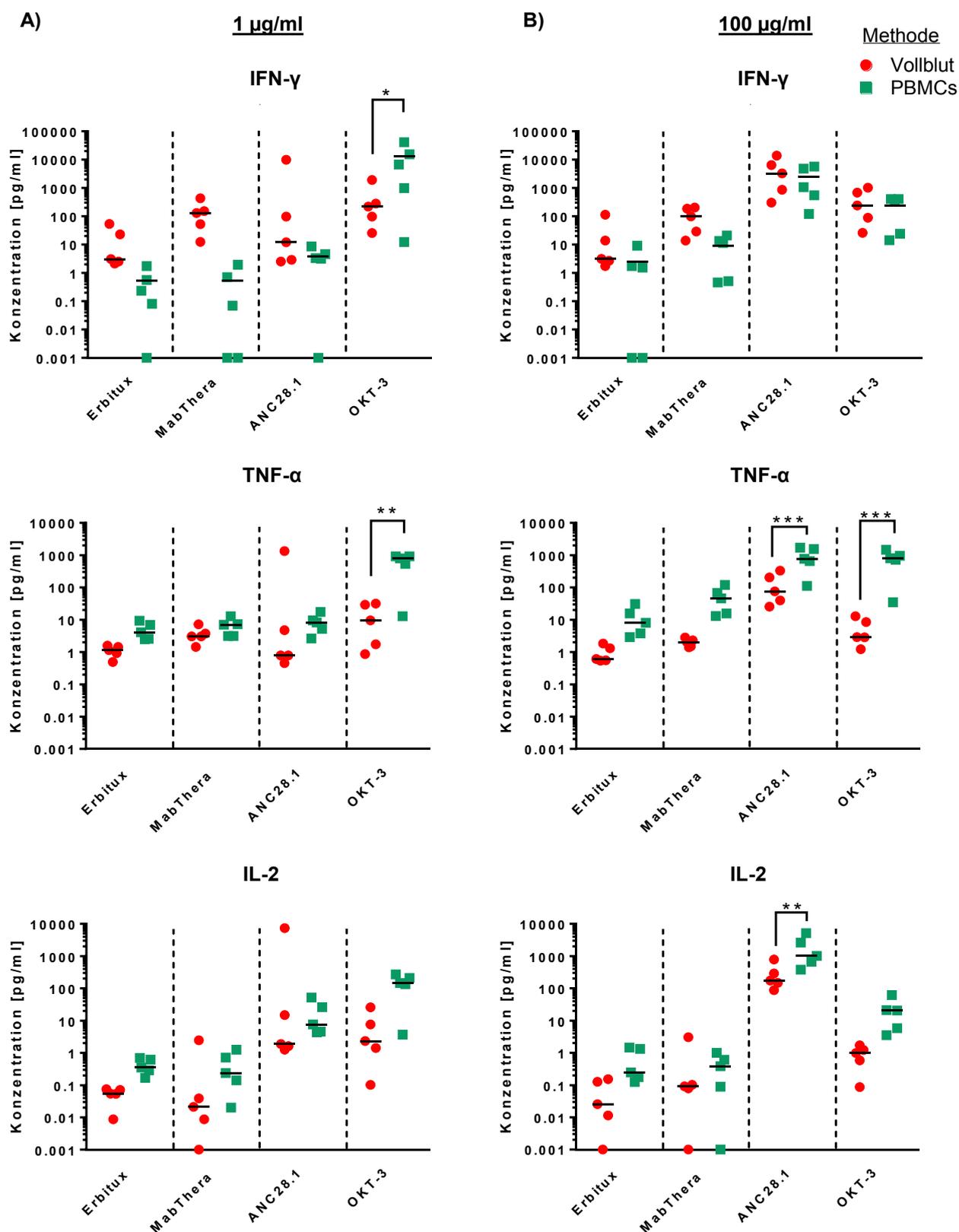


Abbildung 51: Vergleich der Vollblut- und PBMC-Methode anhand der Konzentrationen induzierter Zytokine am Beispiel von IFN- γ , TNF- α und IL-2. Die Daten zeigen die jeweiligen absoluten Zytokinkonzentrationen (pg/ml) nach Stimulation mit unterschiedlichen mAk: A) 1 μ g/ml; B) 100 μ g/ml. Beide Methoden wurden mit Zellen derselben Donoren durchgeführt. Dargestellt sind die Einzelwerte der Donoren (Mittelwerte der technischen Duplikate) mit Median pro Behandlungsgruppe (Querstrich, n=5). Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur, bezogen auf die jeweilige Behandlungsgruppe der Vollblut-Methode, ermittelt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4 Diskussion

Die therapeutische Relevanz von Biologika nimmt stetig zu. Ausschlaggebend hierfür ist vor allem ihre schnelle und targetspezifische Wirkungsweise. Diese Vorteile gegenüber klassischen Arzneimitteln können jedoch auch Auslöser einer Reihe von adversen ADRs in Form einer Überstimulation des Immunsystems im Patienten sein. Folgen dieser gesteigerten Immunstimulation reichen von einer Reduktion der Wirksamkeit des Therapeutikums bis hin zu lebensbedrohlichen Zuständen des Patienten. Trotz einer Richtlinie, die die Notwendigkeit einer präklinischen, immuntoxikologischen Evaluierung von Biologika adressiert, existiert keine definierte Teststrategie zur Identifikation potenziell immunogener Eigenschaften. Darüber hinaus fehlt es bis heute an validierten *in vitro* Methoden. Im Sinne des 3R-Prinzips (*Refine, Reduce, Replace*) (Russell und Burch, 1959) bedarf es insbesondere geeigneter humaner *in vitro* Screening-Modelle, um Biologika bereits in der frühen Entwicklungsphase auf ihr immunogenes Potenzial im Menschen zu untersuchen und mögliche Risiken zu identifizieren.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht die Etablierung zweier *in vitro* Modelle, die unterschiedliche potenzielle ADRs von Biologika adressieren: den Beitrag von T-Zellen zu einer möglichen ADA-Produktion sowie die Induktion eines *Cytokine Release Syndroms*.

4.1 *In vitro* Assay zur Abbildung induzierter Immunreaktionen

Im Gegensatz zu *in vivo* Studien, die sich bei der Analyse von Immunogenität auf die Induktion einer Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten fokussieren, lag der Fokus bei diesem *in vitro* Modell auf früheren Endpunkten. Es wurde die Aktivierung von DCs und eine darauf folgende Initiierung von antigenspezifischen Reaktionen durch T-Lymphozyten untersucht und Bedingungen getestet, die zu einer solchen Aktivierung führen.

4.1.1 Charakterisierung *in vitro* generierter dendritischer Zellen

Wie bereits geschildert spielen DCs als hochpotente professionelle APCs eine entscheidende Rolle bei der Initiierung einer adaptiven Immunreaktion durch die Aktivierung von T-Lymphozyten (Banchereau *et al.*, 2000). Im humanen peripheren Blut machen primäre DCs jedoch nur einen sehr geringen Anteil von 0,1 – 1 % der mononukleären Zellen aus (Freudenthal und Steinman, 1990), wodurch die Ausbeute nach einer direkten Isolation dieser Zellen sehr gering ausfallen würde. Um die Ausbeute an DCs für ihren Einsatz in einem *in vitro* System zu erhöhen, können diese Zellen aus ihren Vorläuferzellen, den Monozyten, *in vitro* generiert werden (Bender *et al.*, 1996; Pickl *et al.*, 1996). Diese Monozyten wurden in der vorliegenden Arbeit entweder kommerziell erworben oder mittels magnetischer Zellseparation

aus PBMCs des humanen, peripheren Blutes gewonnen. In Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen haben Monozyten das Potenzial, sich *in vitro* sowohl zu Makrophagen als auch zu moDCs zu differenzieren (Ahn und Agrawal, 2005; Chapuis *et al.*, 1997; Kiertcher und Roth, 1996; Romani *et al.*, 1996; Sallusto und Lanzavecchia, 1994; Sallusto *et al.*, 1995). Die Identifizierung der *in vitro* generierten Zellen als moDCs erfolgte in der vorliegenden Arbeit anhand ihres Phänotyps, der sich aus ihrem Oberflächenmarkerprofil ergibt, ihrer zellulären Morphologie und ihrer funktionellen Eigenschaften, wie der Fähigkeit zur Endozytose und T-Zell-Aktivierung.

4.1.1.1 Immunphänotyp unreifer dendritischer Zellen

Um den Effekt von GM-CSF und IL-4 auf die Differenzierung von Monozyten zu moDCs zu überprüfen, erwies sich eine kombinierte Analyse der Expression der Oberflächenmarker CD14 und CD11c als geeignet (Lauener *et al.*, 1990; Ruppert *et al.*, 1991; Ruppert *et al.*, 1993). Während CD11c sowohl von Monozyten als auch von myeloiden DCs exprimiert wird, nimmt die Expression des Monozytenmarkers CD14 im Verlauf der Differenzierung zu moDCs ab (Freudenthal und Steinman, 1990; Sallusto und Lanzavecchia, 1994). Diese Abnahme war in den durchgeführten Experimenten bereits ab Tag 3 der Differenzierung sichtbar. An Tag 6 zeigten die Zellen einen für ausdifferenzierte moDCs charakteristischen CD14/CD11c⁺ Phänotyp (Collin *et al.*, 2013). Diese Ergebnisse sind in Einklang mit denen von Chapuis und Kollegen, die ebenfalls zeigten, dass eine Kultivierung von Monozyten mit GM-CSF und IL-4 zu einem Verlust der CD14-Expression führt (Chapuis *et al.*, 1997).

Reziprok zur Abnahme der CD14-Expression während der Differenzierung von Monozyten zu moDCs, kam es gleichzeitig zu einem kontinuierlichen Anstieg der CD209-Expression ab Tag 1 der Kultur. Monozyten hingegen verblieben CD209-negativ. Auch diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen bereits veröffentlichter Studien überein (Bullwinkel *et al.*, 2011; Geijtenbeek *et al.*, 2000b). Die Regulation dieser reziprok veränderten Genexpressionen wird epigenetischen DNA-Modifikationen zugeschrieben (Bullwinkel *et al.*, 2011). CD209 (*dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin*; DC-SIGN) spielt auf moDCs eine entscheidende Rolle bei der Endozytose, der transendothelialen Migration von DCs und der T-Zell-Aktivierung. Zum einen handelt es sich bei diesem Molekül um einen PRR, genauer um einen C-Typ-Lektin-Rezeptor, welcher der Pathogenerkennung und der Induktion einer ersten Immunreaktion dient (Engering *et al.*, 2002; Geijtenbeek und Gringhuis, 2009). Gleichzeitig ist CD209 ein Zelladhäsionsrezeptor und vermittelt sowohl die transendotheliale Migration von DCs durch die Bindung des endothelialen Adhäsionsmoleküls ICAM-2 (Geijtenbeek *et al.*, 2000a) als auch eine Interaktion von DCs und T-Zellen über die transiente Bindung von ICAM-3 auf

Lymphozyten (Geijtenbeek *et al.*, 2000b). Hierbei stabilisiert CD209 die DC-T-Zell-Kontaktzone und ermöglicht die Ligation des TCRs durch moDCs.

HLA-DR (MHC II) hingegen wurde ab Tag 2 auf der Zelloberfläche von bis zu 100 % aller Monozyten und moDCs detektiert. Publierte Studien bestätigen die Beobachtung, dass HLA-DR von beiden Zelltypen exprimiert wird, wenn auch in unterschiedlichen Expressionsstärken (Bertho *et al.*, 2000; Freudenthal und Steinman, 1990; Laupéze *et al.*, 1999). So zeigten die Studien von Laupéze und Kollegen eine 4,6-fach höhere HLA-DR-Expression bei moDCs im Vergleich zu Monozyten auf (Laupéze *et al.*, 1999). Die gesteigerte Expression von HLA-DR auf DCs ist essentiell für eine spätere Präsentation antigener Peptide an Lymphozyten und macht diese Zellen zu potenten APCs. Da HLA-DR in den vorliegenden Experimenten von 100 % der Zellen exprimiert wurde, ließ sich dieses stärkere Expressionslevel bei moDCs im Vergleich zu Monozyten auf Basis des prozentualen Anteils positiver Zellen nicht herausstellen. Infolgedessen wurde für spätere Versuche eine zusätzliche Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) hinzugezogen, um den Einfluss verschiedener Reifungsstimuli auf diesen Marker analysieren zu können. Eine vergleichbare Problematik zeigte sich bei Schlienger *et al.*. Auch sie mussten die Betrachtung der MFI zu ihren Analysen hinzuziehen (Schlienger *et al.*, 2000).

Weitere Oberflächenmarker, die im Verlauf der *in vitro* Differenzierung von Monozyten zu moDCs auch ohne zusätzlichen Reifungsstimulus vermehrt exprimiert werden, sind die kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 (Bertho *et al.*, 2000; Schlienger *et al.*, 2000). Dies ist der *in vitro* Kultivierung an sich zuzuschreiben, die bereits eine Grundaktivierung in den Zellen induzieren kann (Gilliet *et al.*, 2003). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen hiermit überein. Insbesondere CD40 wurde bis Tag 2 der Kultur stark hochreguliert, was möglicherweise eine Reaktion auf die erneute Zugabe von GM-CSF und IL-4 nach 24 bis 48 Stunden war. Im weiteren Verlauf der Kultivierung nahm diese CD40-Expression wieder ab und wurde letztendlich nur noch in geringem Ausmaß detektiert. Ähnlich verhielt es sich bei CD86, wobei die Expression dieses Markers stärkeren Schwankungen unterlag.

Die Expressionen des kostimulatorischen Moleküls CD80 sowie des Reifungsmarkers CD83 auf moDCs waren hingegen erwartungsgemäß niedrig (Bender *et al.*, 1996; Chapuis *et al.*, 1997; Schlienger *et al.*, 2000).

4.1.1.2 Morphologische Charakterisierung

Neben der Entwicklung eines für *in vitro* generierte moDCs charakteristischen Oberflächenmarkerprofils, ließen sich die Zellen auch morphologisch als DCs identifizieren. Die eher kleinen CD14⁺ Zellen zeigten eine für Monozyten typische Morphologie, die durch einen meist exzentrischen, nierenförmigen Zellkern und fehlende zytoplasmatische Fortsätze

gekennzeichnet ist. Nach sechstägiger Kultivierung in Anwesenheit von GM-CSF und IL-4 hatten die Zellen an Größe zugenommen und einen eher runden Zellkern sowie kleine, zytoplasmatische Ausläufer entwickelt, ein charakteristisches Merkmal unreifer DCs (Banchereau und Steinman, 1998; Fontes *et al.*, 2006; Laupéze *et al.*, 1999).

4.1.1.3 Endozytische Fähigkeit

Nach erfolgter phänotypischer und morphologischer Analyse der frisch generierten moDCs, wurden diese Zellen in fortführenden Experimenten auf ihre funktionellen Eigenschaften analysiert. Hier stand zunächst die Untersuchung ihrer Fähigkeit zur Endozytose im Vordergrund.

DCs spielen *in vivo* als professionelle APCs eine zentrale Rolle bei der Induktion immunogener Reaktionen (Steinman, 1991). Als unreife DCs zirkulieren diese Zellen in der Körperperipherie und gehen dort ihrer Aufgabe der Antigenaufnahme und –prozessierung nach. Dafür verfügen sie über eine ausgeprägte endozytische Aktivität. Es ist jedoch bekannt, dass diese Fähigkeit zur Antigenaufnahme beispielsweise bei Langerhans-Zellen, den unreifen DCs der Epidermis, allein durch ihre *in vitro* Kultivierung verloren gehen kann (Romani *et al.*, 1989; Schuler und Steinman, 1985). Folglich galt es, diese endozytische Aktivität der *in vitro* generierten moDCs anhand der Aufnahme und Akkumulation der FITC-konjugierten Makromoleküle OVA und DX zu untersuchen. Bei der Endozytose durch *in vitro* generierte, ausdifferenzierte moDCs an Tag 6 der Kultur zeigten sich deutliche Unterschiede in Abhängigkeit vom aufzunehmenden Makromolekül: Während OVA-FITC vom überwiegenden Anteil der moDCs aufgenommen wurde (94,4 %), akkumulierte DX-FITC bei gleicher Konzentration und vergleichbarer molekularer Masse (OVA: 45 kDa; DX: 40 kDa) in lediglich 32,0 % der Zellen. Auch bei Betrachtung der Endozytose im zeitlichen Verlauf der Differenzierung von Monozyten zu moDCs wird der Unterschied in der Akkumulation beider Moleküle deutlich. Bereits an Tag 0 unterschied sich die Aufnahme der Makromoleküle durch Monozyten. Während OVA zu 60,0 % aufgenommen wurde, akkumulierte DX lediglich zu 12,09 % in den Zellen. Im Gegensatz zur Akkumulation in Monozyten des gleichen Alters resultierte die Differenzierung zu moDCs im zeitlichen Verlauf in einer zunehmenden Akkumulation von DX-FITC. Für OVA hingegen ergaben sich zu keinem Zeitpunkt der Kultur Unterschiede in der endozytischen Aktivität von Monozyten und sich ausdifferenzierenden moDCs. Die unselektive Makropinozytose stellt einen der zwei vorherrschenden Mechanismen zur Aufnahme löslicher Antigene durch DCs dar (Sallusto *et al.*, 1995). Die rezeptorvermittelte Endozytose bildet den zweiten Mechanismus zur Antigenaufnahme (Lanzavecchia, 1990). Veröffentlichte Studien zeigten anhand einer partiellen Suppression der Endozytose von *in vitro* generierten DCs durch den Mannose-Rezeptor-Agonisten Mannan, dass OVA und DX durch die spezifische Mannose-Rezeptor-vermittelte

Endozytose internalisiert werden (Burgdorf *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2000; Sallusto *et al.*, 1995). Für die Unterschiede in der Endozytose beider Makromoleküle ist daher weniger der Weg der Antigenaufnahme durch die Zellen als vielmehr die gewählte Konzentration der Moleküle entscheidend. Diese Konzentration war in den durchgeführten Experimenten mit 0,5 mg/ml für OVA offensichtlich optimal gewählt, sodass bereits zu Beginn der Kultur eine nahezu maximale Endozytose induziert wurde, die keine Unterscheidung zwischen der endozytotischen Fähigkeit von Monozyten und moDCs zuließ. Auch die Natur des Moleküls kann eine Rolle spielen. So ist es möglich, dass OVA-Moleküle größere Komplexe bilden, die schneller und effektiver erkannt und phagozytiert werden. Zusätzlich handelt es sich bei OVA um ein xenogens Protein, was den Effekt einer stärkeren Zellaktivierung unterstützen könnte. Für DX hingegen lag die gewählte Konzentration in einem eher suboptimalen Bereich, sodass sogar minimale Unterschiede in der Endozytose, sowohl zwischen den verschiedenen Zelltypen als auch im zeitlichen Verlauf der Differenzierung von Monozyten zu moDCs, detektiert werden konnten. Dies ermöglichte den Vergleich des endozytotischen Potenzials von Monozyten mit dem von moDCs. Bereits Sallusto *et al.* verglichen die Akkumulation von DX-FITC in humanen Monozyten mit der Akkumulation in *in vitro* generierten humanen moDCs (Sallusto *et al.*, 1995). Während eine 30-minütige Inkubation mit DX-FITC (40 kDa; 1 mg/ml) bei Monozyten in einer medianen Fluoreszenzintensität von 19 resultierte, zeigten die *in vitro* generierten moDCs eine deutlich höhere und zugleich konstitutive Fähigkeit zur Akkumulation von DX-FITC (mediane Fluoreszenzintensität: 3290). Weitere Studien ergaben vergleichbare Tendenzen (Kato *et al.*, 2000). Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nahm die DX-FITC-Akkumulation (40 kDa; 0,5 mg/ml) durch die Differenzierung von Monozyten zu moDCs zu und unterschied sich ab Tag 5 der Kultur (32,11 %) signifikant von der in Monozyten an Tag 0 (12,09 %). Es wurde somit gezeigt, dass die *in vitro* generierten moDCs über die für unreife DCs charakteristische endozytotische Fähigkeit zur Antigenaufnahme verfügen.

In vivo reifen DCs nach erfolgter Antigenaufnahme und verlieren während dieses Prozesses ihre Fähigkeit zur Antigenaufnahme. Auch *in vitro* ist die Reifung von moDCs mit einer reduzierten Fähigkeit zur Antigenaufnahme assoziiert (Sallusto *et al.*, 1995). Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einem weiteren Schritt die endozytotische Aktivität gereifter moDCs untersucht. Um eine Reifung dieser Zellen artifiziell zu induzieren, wurden sie während ihrer Differenzierung für die letzten 48 bzw. 96 Stunden mit TNF- α inkubiert. TNF- α wird *in vivo* unter anderem von aktivierten Makrophagen als Reaktion auf Pathogene sezerniert. Als proinflammatorisches Zytokin spielt es daher auch bei der Reifung und Migration der DCs nach Antigenkontakt eine Rolle (Cumberbatch und Kimber, 1992). In den durchgeführten Experimenten zeigte sich bereits nach 48-stündiger Inkubation mit diesem Reifungsstimulus eine reduzierte Akkumulation von DX-FITC in moDCs im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Eine auf 96 Stunden verlängerte Inkubation resultierte in einer signifikanten Abnahme der endozytotischen Aktivität der moDCs.

Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen publizierter Studien überein. Sallusto *et al.* zeigten, dass bereits eine 40-stündige Inkubation der *in vitro* generierten moDCs mit verschiedenen Aktivierungsstimuli (TNF- α , IL-1 β oder LPS) eine irreversible Veränderung in diesen Zellen initiierte. Diese war unter anderem mit einer ausgeprägten Reduktion der endozytotischen Fähigkeit assoziiert, die sowohl aus einer verminderten Makropinozytose als auch aus der reduzierten Expression des Mannose-Rezeptors resultierte (Sallusto *et al.*, 1995). In den Folgejahren wurden die Erkenntnisse einer herunter regulierten Endozytose bei reifen DCs in weiteren Studien durch die Behandlung der Zellen mit verschiedenen Reifungsstimuli (TNF- α , LPS, IL-1 β , CD40L) bestätigt (Ahn und Agrawal, 2005; John *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 1999). Zudem fanden John und Kollegen heraus, dass eine Kryokonservierung von *in vitro* generierten, unreifen moDCs und ihre anschließende Revitalisierung zu einem erhöhten Reifestatus und einer damit einhergehenden reduzierten endozytotischen Aktivität im Vergleich zu frisch generierten, unreifen moDCs führte (John *et al.*, 2003). Aufgrund vergleichbarer eigener Beobachtungen (Daten nicht gezeigt) wurden diese Zellen in der vorliegenden Arbeit vor jedem Experiment frisch aus Monozyten generiert.

Es war somit möglich moDCs *in vitro* zu generieren, die sowohl charakteristische phänotypische und morphologische Eigenschaften aufwiesen als auch zur Antigenaufnahme fähig waren. Darüber hinaus zeigten sie eine für DCs charakteristische Reduktion der endozytotischen Aktivität nach erfolgtem Reifungsstimulus.

4.1.1.4 Einfluss von Reifungsstimuli auf den Immunphänotyp

Die Reifung von DCs ist ein terminaler Differenzierungsprozess, der dem Funktionswechsel dieser Zellen von der Antigenaufnahme und –prozessierung zur Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung dient (Banchereau und Steinman, 1998; Bell *et al.*, 1999; Cella *et al.*, 1997; Steinman, 1991). Induziert wird diese Reifung *in vivo* durch *Danger*-Signale wie PAMP oder inflammatorische Mediatoren, welche als Reaktion auf Entzündungsprozesse oder Gewebsschädigungen von verschiedenen Zelltypen freigesetzt werden (Matzinger, 2002). Die Möglichkeiten moDCs *in vitro* artifiziell zur Ausreifung zu bringen sind vielfältig. Oft verwendete Stimulantien sind inflammatorische Signalmoleküle in Form von Zytokinen oder Membranliganden wie TNF- α , LPS und CD40L (Bertho *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2012; Rescigno *et al.*, 1998; Sallusto *et al.*, 1995; Sallusto und Lanzavecchia, 1994). Ein weiterer, besonders potenter Stimulus zur Induktion der Zellreifung wurde 1997 erstmals von Jonuleit *et al.* beschrieben. Hierbei handelte es sich um eine Kombination der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α mit PGE2 (Jonuleit *et al.*, 1997). Auch in den Folgejahren fand dieser sogenannte „Cocktail“ *in vitro* zur Reifungsinduktion von DCs Anwendung (Berger *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Lokshin *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden die *in vitro* generierten

moDCs, in Anlehnung an diese Studien, für 48 Stunden mit TNF- α , LPS oder einem proinflammatorischen Cocktail, bestehend aus IL-1 β , IL-6, TNF- α und PGE2, behandelt. Die immunphänotypische Analyse der stimulierten moDCs ergab ein Expressionsprofil der analysierten Oberflächenmarker, welches für gereifte moDCs charakteristisch ist. Des Weiteren wurde die unterschiedliche Potenz der einzelnen Reifungsstimuli deutlich. TNF- α hatte den geringsten Einfluss auf das Oberflächenmarkerprofil der moDCs und stellte so den schwächsten Reifungsstimulus dar. Interessant ist, dass dieser Stimulus in den vorherigen Experimenten dennoch ausreichte, um die endozytische Aktivität der moDCs herunter zu regulieren (Kap. 3.1.2). LPS und der proinflammatorische Cocktail beeinflussten die Expression aller analysierten Oberflächenmarker hingegen signifikant, wobei der Cocktail der potenteste der drei Reifungsstimuli war. Auch in anderen Studien stellte dieser den effizientesten Reifungsstimulus im Vergleich zu TNF- α und LPS dar (Jonuleit *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2012).

Das aus der 48-stündigen Stimulation mit verschiedenen Reifungsstimuli resultierende Expressionsprofil der moDCs zeigte eine erhöhte Expression der Oberflächenantigene CD83, CD80, CD86, CD40 und HLA-DR. Die Expression dieser Marker diente auch in der Vergangenheit bereits in einer Vielzahl von Studien als Indikator einer erfolgreichen Reifung von *in vitro* generierten DCs (Ahn und Agrawal, 2005; Bender *et al.*, 1996; Berger *et al.*, 2002; Bertho *et al.*, 2000; Rescigno *et al.*, 1998; Romani *et al.*, 1996; Sallusto und Lanzavecchia, 1994; Sallusto *et al.*, 1995; Zhou und Tedder, 1995).

Die Expression des Oberflächenmarkers CD83 wurde im Vergleich zu den übrigen analysierten Markern durch die Reifungsstimuli am stärksten beeinflusst. So konnten Induktionen zwischen dem 8- (TNF- α) und 15-fachen (Cocktail) im Vergleich zur Expression auf unreifen moDCs detektiert werden. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit einer Vielzahl von Studien, in denen CD83 als Reifungsmarker von DCs hervorgehoben wird (Lechmann *et al.*, 2002a; Zhou und Tedder 1995; Zhou und Tedder, 1996). Auch in den Studien von Jonuleit *et al.* steigerte eine 48-stündige Stimulation der moDCs mit dem gleichen proinflammatorischen Cocktail die CD83-Expression auf moDCs um das 16-fache im Vergleich zur Expression auf unstimulierten moDCs (Jonuleit *et al.*, 1997). CD83 nimmt eine wichtige Rolle bei der Modulation der Immunantwort ein, indem seine Bindung durch T-Zellen ein wesentliches kostimulatorisches Signal für diese Zellen bereitstellt. Eine Vielzahl von Studien belegt, dass die CD83-Expression auf DCs mit ihrer Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation korreliert (Aerts-Toegaert *et al.*, 2007; Jonuleit *et al.*, 1997; Kruse *et al.*, 2000a; Kruse *et al.*, 2000b; Lechmann *et al.*, 2002b; Sénéchal *et al.*, 2004; Zhou und Tedder, 1995).

Auch die in den Experimenten detektierte Zunahme der Expression von CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2/B70) nach Aktivierung der DCs mit den verschiedenen Reifungsstimuli ist mit ihrer Rolle als kostimulatorische Moleküle bei einer T-Zell-Aktivierung zu erklären und wird durch eine Reihe von Studien bestätigt (Bertho *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Rescigno *et al.*, 1998;

Sallusto und Lanzavecchia, 1994; Sallusto *et al.*, 1995). Die Beteiligung dieser beiden Transmembranglykoproteine an einer optimalen T-Zell-Stimulation als Liganden des kostimulatorischen T-Zell-Rezeptors CD28 wurde von Azuma *et al.* beschrieben (Azuma *et al.*, 1992; Azuma *et al.*, 1993). *In vitro* Studien mit mAk zur Inhibierung von CD80- und CD86-Antigenen nach erfolgter Reifung der DCs ergaben, dass die Inhibierung von CD86 die T-Zell-stimulierenden Fähigkeiten der DCs um ein Vielfaches stärker reduzierte (71 %) als eine Inhibierung von CD80 (24 %) (Dilioglou *et al.*, 2003). Weitere Studien zeigten ähnliche Beobachtungen (Manickasingham *et al.*, 1998; McLellan *et al.*, 1995; Zhou und Tedder, 1995) und identifizierten CD86 als Hauptliganden für CD28 (Caux *et al.*, 1994). Diese Ergebnisse verdeutlichen die funktionelle Wichtigkeit einer gesteigerten Expression von kostimulatorischen Molekülen auf DCs als Reaktion auf einen inflammatorischen Reifungsstimulus.

Die Expression von CD40 nahm nach erfolgtem Reifungsstimulus mit LPS und dem proinflammatorischen Cocktail zu, nicht aber nach Stimulation mit TNF- α . Für TNF- α lag die CD40-Expression sogar minimal unter der Expression, die in den Kontrollansätzen detektiert wurde. Bei CD40 handelt es sich um einen Oberflächenrezeptor der TNF-Rezeptor-Familie, der auf DCs als Reaktion auf einen Reifungsstimulus (z.B. mikrobielle Produkte) hochreguliert wird (Banchereau *et al.*, 1994; Hellman und Eriksson, 2007; Kawai und Akira, 2007). Eine Stimulation von CD40 auf moDCs setzt in diesen Zellen über die Rekrutierung von TNFR-assoziierten Faktoren (*Tumor necrosis factor receptor-associated factors*; TRAFs) (überwiegend TRAF6; Ishida *et al.*, 1996) Signalkaskaden in Gang. Diese aktivieren letztendlich Gene, die vor allem in die Produktion inflammatorischer Zytokine sowie die Expression kostimulatorischer Moleküle involviert sind (Cella *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2004; O'Sullivan und Thomas, 2003; Pullen *et al.*, 1999; Yanagawa und Onoé, 2006). Somit wäre in den vorliegenden Experimenten eine gesteigerte TNF- α -induzierte CD40-Expression auf moDCs zu erwarten gewesen. Darüber hinaus zeigten Studien, dass sogar mit niedrigeren TNF- α -Konzentrationen (10 ng/ml) und nach nur 24-stündiger Stimulation eine Erhöhung der CD40-Expression auf moDCs induziert werden konnte (Sallusto und Lanzavecchia, 1994). Infolgedessen muss der ohnehin recht hohe prozentuale Anteil an CD40-positive moDCs in den Kontrollansätzen ausschlaggebend dafür gewesen sein, dass der TNF- α -Stimulus, der sich bei den übrigen analysierten Markern bereits als schwächster Stimulus herausgestellt hatte, nicht ausreichte, um eine weitere Steigerung der Expression zu induzieren. Da die übrigen analysierten Oberflächenmarker nach TNF- α -Stimulation das für gereifte DCs charakteristische Expressionsprofil zeigten, kann eine nicht erfolgte Reifung der moDCs ausgeschlossen werden. Aufgrund der Tatsache, dass die *in vitro* generierten moDCs *per se* HLA-DR-positiv waren (Kap. 3.1.1), erwies sich eine Analyse der HLA-DR-Expression über die MFI oder den Anteil HLA-DR^{high}-exprimierender Zellen als geeignet, um eine gesteigerte Expression nach erfolgtem Reifungsstimulus zu detektieren. Durch die gesteigerte HLA-DR-Expression sind reife DCs in

der Lage, schnell viele antigene Peptide nach der Exposition gegenüber einem inflammatorischen Stimulus an MHC-Klasse-II-Moleküle zu binden und so die Präsentation dieser Antigene zu begünstigen (Cella *et al.*, 1997).

Bei Betrachtung der Expression von CD209 (DC-SIGN) wird ersichtlich, dass dies der einzige Marker ist, dessen Expression mit zunehmender Reifung der moDCs herunter reguliert wurde. So wurde CD209 auf unreifen moDCs stark exprimiert, während insbesondere LPS- und Cocktail-behandelte moDCs niedrigere CD209-Expressionen aufwiesen (Engering *et al.*, 2002; Geijtenbeek *et al.*, 2000b; Yang *et al.*, 2008). Bei CD209 handelt es sich unter anderem um ein Adhäsionsmolekül, das insbesondere auf aktivierten DCs exprimiert wird und für die Bildung der DC-T-Zell-Synapse essentiell ist. Folglich lässt sich die verminderte CD209-Expression auf moDCs nach erfolgtem Reifungsstimulus nicht mit seiner Rolle als Adhäsionsmolekül erklären. Jedoch könnte die reduzierte Expression von CD209 mit seiner zusätzlichen Funktion als C-Typ-Lektin-Rezeptor (eine Klasse von PRRs) in Verbindung stehen (Engering *et al.*, 2002). Da die Antigenaufnahme von DCs unter anderem durch Phagozytoserezeptoren vermittelt wird, und ein Reifungsstimulus bei moDCs durch die reduzierte Expression des Mannose-Rezeptors zu einer verminderten Endozytose führen kann, liegt die Vermutung nahe, dass auch andere Phagozytoserezeptoren wie CD209 (Engering *et al.*, 2002) durch einen solchen Stimulus auf ähnliche Weise beeinflusst werden. Yang *et al.* zeigten, dass LPS-behandelte DCs im Vergleich zu unbehandelten (unreifen) DCs signifikant niedrigere Level an Phagozytoserezeptoren wie den Mannose-Rezeptor (CD206), Fcγ-Rezeptoren (FcγRs; CD32) und DC-SIGN (CD209) exprimieren und dass diese verminderten Expressionen mit einer herunter regulierten endozytotischen Aktivität der DCs korrelieren (Yang *et al.*, 2008).

Die zuvor beschriebene reduzierte endozytotische Aktivität der *in vitro* generierten moDCs nach erfolgtem Reifungsstimulus ist somit von immunphänotypischen Veränderungen der Zellen begleitet. Diese umfassen eine verminderte Expression von CD209 und eine Hochregulierung von MHC-Klasse-II- sowie kostimulatorischen Molekülen und Reifungsmarkern. Diese Veränderungen stimmen mit den *in vivo* auftretenden Ereignissen während der Reifung von DCs nach Antigenaufnahme überein, die während ihrer Migration vom nicht-lymphoiden Gewebe in die sekundären lymphoiden Organe erfolgt (Cella *et al.*, 1997; Steinman und Swanson, 1995). All dies charakterisiert die *in vitro* generierten und stimulierten moDCs als reife DCs, die alle Voraussetzungen für eine effiziente Antigenpräsentation, die Bildung der immunologischen Synapse und für eine optimale T-Zell-Stimulation erfüllen (Banchereau *et al.*, 2000).

Die Fähigkeit der gereiften moDCs zur T-Zell-Stimulation wurde in den folgenden Experimenten analysiert.

4.1.1.5 Einfluss von Reifungsstimuli auf die T-Zell-stimulatorische Fähigkeit

In vivo fungieren DCs nach ihrer Reifung als potente APCs und sind in der Lage, naive CD4⁺ T-Lymphozyten zur klonalen Expansion zu aktivieren. Es existiert eine Reihe von Studien an humanen DCs, die zeigen, dass diese Zellen als potente APCs T-Zellen auch *in vitro* aktivieren können. Die Mehrheit dieser Untersuchungen beschränkt sich allerdings auf die Analyse einer sekundären Immunreaktion auf Fremdartigene (*recall response*) oder einer Reaktion auf Alloantigene in einer MLR (Freudenthal und Steinman, 1990; Markowicz und Engleman, 1990; Presicce *et al.*, 2008; van Voorhis *et al.*, 1983; Young und Steinman, 1988). Bei einer funktionellen Charakterisierung von DCs sollte jedoch die einzigartige Fähigkeit dieser Zellen berücksichtigt werden, bereits nach Erstkontakt eine antigenspezifische T-Zell-Proliferation zu induzieren. Diesen Prozess galt es *in vitro* im Rahmen einer autologen Kokultur, bestehend aus diesen beiden immunkompetenten Zelltypen, abzubilden.

Die Kokultivierung der gereiften moDCs mit autologen CD4⁺ T-Lymphozyten resultierte in der zu erwartenden Aktivierung der T-Zellen. Diese Aktivierung ließ sich anhand der Induktion des Aktivierungsmarkers CD25 auf der Oberfläche der CD4⁺ T-Zellen sowie der induzierten T-Zell-Proliferation detektieren (Caruso *et al.*, 1997; Rogers *et al.*, 1997). Bei CD25 handelt es sich um die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors (IL-2-R), die von T-Lymphozyten nach erfolgter Aktivierung durch ein Antigen oder *Bystander*-Effekte exprimiert wird. Die Expression der α -Untereinheit verstärkt die Affinität des Rezeptors zu Interleukin-2 (IL-2), einem Wachstumsfaktor, der die Proliferation der T-Zellen stimuliert (Cantrell und Smith, 1984; Gaffen, 2001; Malek, 2008). Nach ihrer Stimulation entwickeln sich naive T-Lymphozyten somit vermehrt zu CD4⁺/CD25⁺ Effektorzellen. Neben aktivierten T-Lymphozyten wird CD25 insbesondere von T_{reg}-Zellen stark exprimiert. Diese Subpopulation zeichnet sich darüber hinaus durch die Expression des Transkriptionsfaktors *Foxp3* und einer herunter regulierten Expression von CD127 aus und macht lediglich einen sehr kleinen Anteil der CD4⁺ Zellpopulation aus (Chen *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006; Rudensky, 2011; Seddiki *et al.*, 2006). Dieser Zelltyp wurde daher in den hier durchgeführten Experimente nicht näher betrachtet.

In den vorliegenden Experimenten dienten Kokulturen von T_H-Zellen mit unreifen moDCs als Negativkontrolle. Diese Kokultivierung resultierte in einer basalen Aktivierung der T-Zellen. Da unreife moDCs MHC II- (HLA-DR-) und in geringem Maße kostimulatorische Moleküle exprimierten, war eine geringfügige Grundaktivierung der T-Zellen durch eine Kokultivierung mit unstimulierten moDCs zu erwarten gewesen. Die basale Aktivierung kokultivierter T-Zellen ist kein unbekanntes Phänomen, sondern wurde auch im Rahmen anderer *in vitro* Studien beobachtet (Mehta-Damani *et al.*, 1995; Millard *et al.*, 2003; Presicce *et al.*, 2008). Während die Grundaktivität in den Studien von Presicce *et al.* vermutlich auf die allogene Abstammung der

beiden Zelltypen zurückzuführen war, bezeichneten sowohl Mehta-Damani und Kollegen als auch Millard *et al.* diese Aktivierung als Autoreaktivität der Zellen. Als Ursache zogen sie exogene Stimuli während der Zellisolation, wie beispielsweise FCS, heran. Auch in der vorliegenden Arbeit kann das im Kulturmedium enthaltene FCS eine Ursache für die resultierende Voraktivierung der unstimulierten moDCs sein. Dennoch ist der Gebrauch von FCS zur *in vitro* Kultivierung humaner Zellen nicht unüblich (Bender *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2012; Presicce *et al.*, 2008; Sallusto und Lanzavecchia, 1994, Sallusto *et al.*, 1995). Eine Möglichkeit, den Einfluss von FCS auf die Zellen zu untersuchen, wäre der alternative Gebrauch von autologem Spenderserum. So zeigten Gilliet *et al.*, dass DCs, die in Anwesenheit von autologem Plasma anstelle von FCS generiert wurden, weniger CD80 exprimierten (Gilliet *et al.*, 2003). Da in der vorliegenden Arbeit jedoch kommerziell erhältliche primäre, humane Monozyten verwendet wurden, stellte die Verwendung von autologem Serum keine Option dar. Zusätzlich muss bedacht werden, dass die Proliferation der T-Lymphozyten durch die Verwendung des Proliferationsmarkers PKH26 bereits ab Tag 0 der Kultur detektiert wurde. Hierdurch könnten anfängliche, stressinduzierte Reaktionen der Zellen in die Analyse mit eingeflossen sein. Dies hätte durch eine Verwendung von Proliferationsmarkern, die eine Messung der Proliferation zu einem definierten Zeitpunkt der Kultur ermöglichen (^3H -Thymidin, BrdU, EdU), umgangen werden können. Allerdings würde dann die erhöhte Schwierigkeit bestehen, den optimalen Zeitpunkt für die Analyse der Proliferation zu definieren. Zudem verfügt eine Messung der Proliferation mittels PKH26 über zahlreiche Vorteile gegenüber diesen alternativen Methoden. Hierzu zählen seine lange Halbwertszeit (Wochen bis Monate) und die Möglichkeit, diesen Marker bei der durchflusszytometrischen Analyse mit mAk gegen Zelloberflächenmarker zu kombinieren (Allsopp *et al.*, 1998; Parish, 1999).

ConA-behandelte Monokulturen von T-Zellen dienten als Positivkontrolle und resultierten in einer signifikanten Induktion der Proliferation und Expression des Aktivierungsmarkers CD25 im Vergleich zur Negativkontrolle. In der Immunologie wird ConA als polyklonales Mitogen eingesetzt. Im Gegensatz zu spezifisch an Rezeptoren bindende Antigene führt ConA zu einer unspezifischen Stimulation der T-Lymphozyten, aktiviert jedoch die gleichen Mechanismen wie ein Antigen (Andersson *et al.*, 1972; Dwyer und Johnson, 1981). Die Zellaktivierung erfolgt über eine Stimulation des CD3-Komplexes der T-Lymphozyten (Palacios, 1982) sowie über eine Stimulation der Produktion mitogener Faktoren (Mackler *et al.*, 1972; Smith und Barker, 1972; Paetkau *et al.*, 1976). Diese Positivkontrolle belegte somit, dass es sich bei den kultivierten T-Zellen um vitale, funktionsfähige und induzierbare Zellen handelte.

Die Ergebnisse der Kokulturen bestätigen, dass die zuvor gereiften moDCs über alle nötigen Eigenschaften verfügten, um die CD4^+ T-Zellen in diesem sechstägigen Kokulturmodell zur Proliferation und CD25-Expression zu stimulieren. Die Stärke der induzierten T-Zell-Aktivierung spiegelte den Einfluss der jeweiligen Reifungsstimuli auf das Expressionsprofil der

Oberflächenmarker der moDCs wider. Somit hatten die Cocktail-gereiften moDCs den stärksten und zugleich einen signifikanten Einfluss auf die induzierte T-Zell-Aktivierung. Obwohl für solch eine Aktivierung eine Vielzahl von Bedingungen erfüllt sein muss, war das Ausmaß dieser Aktivierung mit dem der unspezifischen Aktivierung der T-Lymphozyten durch ConA vergleichbar. Die Kokultur von T-Lymphozyten mit LPS-gereiften moDCs resultierte in einer ähnlich starken T-Zell-Aktivierung, wies jedoch eine größere Variabilität in der Aktivierung der Zellen zwischen den einzelnen Ansätzen auf. Dies wurde an der höheren Standardabweichung deutlich. Der Vergleich des Oberflächenmarkerprofils der Cocktail-gereiften moDCs mit dem der LPS-gereiften moDCs zeigt, dass sich diese lediglich in der Expressionsstärke von CD40 unterschieden. Die CD40-Expression wurde bei Cocktail-gereiften moDCs signifikanter induziert ($p < 0,0001$) als bei LPS-gereiften Zellen ($p < 0,05$). Dennoch lassen sich hiermit möglicherweise die Unterschiede in den Standardabweichungen der T-Zell-Proliferationen erklären. Eine erhöhte Expression von CD40 auf DCs kann zu einer gesteigerten Ligation durch CD40L (CD154), einem wichtigen Effektormolekül auf aktivierten T-Zellen, führen. Dies wiederum induziert weitere Mediatoren, die eine verstärkte Aktivierung der T-Zellen und ihre klonale Vermehrung unterstützen. CD40-CD40L-Interaktionen regulieren nicht nur Adhäsions- und kostimulatorische Moleküle auf DCs hoch, sondern sind auch für die Stimulation einer IL-12-Produktion durch DCs essentiell, welche wiederum die Entstehung einer T_H1 -Reaktion begünstigt (Cella *et al.*, 1996). *In vivo* blieb in CD40L-defizienten Mäusen eine effektive T-Zell-Reaktion aus, was durch die fehlende Fähigkeit der T-Zellen zur Auslösung einer IL-12-Produktion bei DCs erklärt werden konnte (Grewal *et al.*, 1995). Es besteht die Möglichkeit, dass durch die stärkere CD40-Expression auf Cocktail-gereiften moDCs in diesen Ansätzen vermehrt Mediatoren freigesetzt wurden, die eine T-Zell-Aktivierung positiv verstärkten. Dies könnte dazu beigetragen haben, dass die Variabilität zwischen den einzelnen Ansätzen und folglich die Standardabweichungen kleiner ausfielen. TNF- α -gereifte moDCs hingegen induzierten die geringste T-Zell-Aktivierung in den Kokulturen. Dennoch lag diese deutlich über der T-Zell-Aktivierung in den Kontrollkulturen. Die Expression von CD83, CD86 und HLA-DR auf TNF- α -gereifte moDCs war mit der auf Cocktail- und LPS-gereiften moDCs vergleichbar, die CD40-Expression lag unter der von unreifen moDCs. Infolgedessen ist zu vermuten, dass die im Vergleich niedrige CD80-Expression einen entscheidenden Einfluss auf die relativ geringe T-Zell-Stimulation ausübte. Diese Beobachtung wird durch die Funktion dieses Transmembranglykoproteins als einer der zwei kostimulatorischen Liganden für den kostimulatorischen T-Zell-Rezeptor CD28 untermauert.

Zusammengefasst führte die Stimulation der *in vitro* aus humanen Monozyten generierten moDCs mit inflammatorischen Signalmolekülen wie TNF- α , LPS oder einem proinflammatorischen Cocktail zu einem Erscheinungsbild der DCs, welches phänotypisch und funktionell denen reifer DCs entspricht (Romani *et al.*, 1996; Sallusto und Lanzavecchia., 1994;

Sallusto *et al.*, 1995). So war es der sechstägigen Kokultur von gereiften moDCs mit autologen, naiven CD4⁺ T-Zellen möglich, die T-Zell-stimulatorische Fähigkeit der generierten moDCs nachzuweisen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Einflussstärke der einzelnen Stimuli auf das Oberflächenmarkerprofil der moDCs mit dem Ausmaß der induzierten T-Zell-Aktivierung korreliert.

4.1.2 Primärantwort auf Modell-Antigene *in vitro*

Nach erfolgreicher Etablierung des *in vitro* Kokultursystems zur Abbildung einer induzierten Primärantwort galt es zu untersuchen, inwieweit sich mit diesem System Immunreaktionen auf bekannte, hoch immunogene Antigene abbilden lassen. Hierzu wurden die primären Reaktionen auf die Modell-Antigene KLH und OVA untersucht.

KLH ist ein hochmolekulares Protein aus der Hämolymphe der Großen Kalifornischen Schlüssellocknapfschnecke (*Megathura crenulata*), das seit vielen Jahren in der immunologischen Forschung insbesondere zur Untersuchung der Induktion von antigenspezifischen T-Zell-Reaktionen eingesetzt wird (Curtis *et al.*, 1970; Curtis und Hersh, 1972; Harris und Markl, 1999; Weigle, 1964). Bei OVA handelt es sich um ein Glykoprotein, welches Hauptbestandteil des Hühnereiweißes ist und in der immunologischen Forschung ebenfalls als etabliertes Modell-Antigen vor allem zur Induktion von Atemwegshypersensitivität zum Einsatz kommt (Hessel *et al.*, 1995).

Da es sich bei beiden Proteinen um xenogene Antigene handelt, war zu erwarten, dass eine *in vitro* Kokultivierung von KLH- bzw. OVA-stimulierten moDCs mit autologen CD4⁺ T-Zellen eine primäre Immunreaktion induziert. Auch hier wurde der Einfluss der jeweiligen Antigene sowohl auf die DC-Aktivierung als auch auf eine induzierte antigenspezifische T-Zell-Proliferation und CD25-Expression untersucht.

Reaktionen der kokultivierten Zellen auf das Immunogen KLH

Zunächst wurden die *in vitro* induzierten Reaktionen auf das Modell-Antigen KLH analysiert. *In vivo* wurde bereits gezeigt, dass KLH das Immunsystem aktiviert und unter anderem zu einer T-Zell-abhängigen Antikörperproduktion führt (Lebrec *et al.*, 2014). Darüber hinaus zeigten Studien, dass KLH-Präparationen von verschiedenen kommerziellen Quellen mit unterschiedlicher Immunogenität assoziiert sind (Herscowitz *et al.*, 1972; Lebrec *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2005). Aus diesem Grund wurden die Experimente dieser Arbeit zunächst an drei hochmolekularen KLHs von verschiedenen Herstellern durchgeführt. Hierbei handelte es sich um die KLHs der Firmen Sigma-Aldrich, Merck Millipore (Endotoxingehalt: ≤ 12 EU/mg) und Thermo Fisher Scientific/Pierce Biotechnology. Letzteres wurde sowohl in ursprünglichem als auch in dialysiertem Zustand eingesetzt.

Eine 48-stündige Stimulation der *in vitro* generierten moDCs mit den unterschiedlichen KLHs gleicher Konzentration (100 µg/ml) brachte erste deutliche Unterschiede in der Expression der einzelnen Oberflächenmarker hervor. Das KLH der Firma Sigma hatte den stärksten Einfluss auf das Oberflächenmarkerprofil der moDCs. Es kam zu einer starken Zunahme der Expression von CD80, CD83 und CD86 sowie zur Abnahme der CD209-Expression. Die stärkste Induktion zeigte CD86. Die induzierten Expressionen der kostimulatorischen Moleküle (CD80, CD83, CD86) waren signifikant gegenüber denen nach Stimulation mit den anderen KLHs, bei denen die Expression dieser Marker im Vergleich zur Negativkontrolle nahezu unbeeinflusst blieb oder sogar unter dieser lag. Die größten Unterschiede wurden zwischen den Sigma- und Merck-KLH-induzierten Expressionsprofilen auf der Oberfläche der DCs detektiert. Vergleichbare Unterschiede zwischen den einzelnen KLHs konnten auch bei einer niedrigeren Konzentration von 25 µg/ml herausgestellt werden. Darüber hinaus zeigte sich, dass der Einfluss von Sigma-KLH auf die Expression der Oberflächenmarker mit steigender Konzentration von 25 µg/ml auf 100 µg/ml zunahm. Aufgrund der größten Unterschiede im Einfluss auf das Expressionsprofil der moDCs wurde im Anschluss die Fähigkeit der Sigma-KLH-stimulierten sowie der Merck-KLH-stimulierten moDCs zur Induktion einer primären Immunreaktion in Form einer Aktivierung autologer CD4⁺ T-Zellen untersucht. Die Expressionsprofile der stimulierten moDCs ließen vermuten, dass die erhöhte Expression der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 sowie des Reifungsmarkers CD83 auf Sigma-KLH-stimulierten moDCs eine gesteigerte Aktivierung der kokultivierten CD4⁺ T-Lymphozyten induzieren könnte. Die durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Proliferation und der Expression des Aktivierungsmarkers CD25 bestätigte dies. Auch bei den Endpunkten der T-Zell-Aktivierung zeigten sich konzentrationsabhängige Reaktionen auf das Sigma-KLH. Mit zunehmender Konzentration des KLH-Stimulus nahm auch der Aktivierungsgrad der T-Lymphozyten zu. Merck-KLH-stimulierte moDCs, bei denen die Expression der kostimulatorischen Moleküle ausblieb, konnten keine Aktivierung der kokultivierten T-Zellen induzieren. Erwartungsgemäß korrelierte die Einflusstärke der beiden KLHs auf das Oberflächenmarkerprofil der moDCs somit mit dem Aktivierungsgrad der T-Lymphozyten. Eine Grundexpression von MHC II (HLA-DR) reichte nicht aus, um eine ausgeprägte Aktivierung dieser Zellen zu induzieren. Dies stimmt mit der Situation *in vivo* überein: Werden Antigene ohne ein sogenanntes *Danger*-Signal erkannt, welches die Expression kostimulatorischer Moleküle induziert, entsteht *in vivo* anstelle einer antigenspezifischen Immunreaktion eine T-Zell-Toleranz gegenüber dem Antigen (Schwartz *et al.*, 1989). Diese Ergebnisse unterstreichen nochmal die funktionelle Wichtigkeit der gesteigerten Expression kostimulatorischer Moleküle auf DCs für die Vermittlung einer primären T-Zell-Aktivierung.

Die beschriebenen Unterschiede der detektierten Reaktionen in Abhängigkeit vom verwendeten KLH könnten die divergierenden Resultate publizierter Studien erklären. So zeigten Mehta-

Damani und Kollegen, dass eine siebentägige *in vitro* Kokultur von humanen DCs mit autologen CD4⁺ T-Zellen (1:10) unter Zugabe von KLH der Firma Sigma (25 µg/ml) eine primäre Immunreaktion in Form einer T-Zell-Proliferation initiierte (Mehta-Damani *et al.*, 1995). Eine weitere Studie zur Untersuchung des immunogenen Potenzials von KLH ergab vergleichbare Ergebnisse. Auch hier wurde das KLH der Firma Sigma verwendet, welches *in vitro* eine dosis- und zeitabhängige Zunahme der Expression der Oberflächenmarker CD80, CD83, CD86, CD40 und HLA-DR auf moDCs induzierte. Ihre daraus resultierende stimulatorische Aktivität zeigte sich in der initiierten Proliferation von Monozyten-abgereicherten PBMCs in einer sechstägigen Kokultur mit KLH-behandelten DCs (20:1). Obwohl Presicce und Kollegen Zelltypen allogener Abstammung einsetzten, unterschied sich die PBMC-Proliferation, die durch die KLH-behandelten DCs induziert wurde (31,40 % ± 6,32), signifikant von der nach Kokultivierung mit unbehandelten moDCs (18,28 % ± 2,21) (Presicce *et al.*, 2008). In den Experimenten der vorliegenden Arbeit hingegen wurden Zelltypen autologer Abstammung eingesetzt, um eine gewisse Vergleichbarkeit der *in vitro* und *in vivo* Situationen zu gewährleisten. Dennoch stimmen die Ergebnisse des Sigma-KLHs mit denen von Presicce *et al.* überein. Hierzu konträre Ergebnisse brachten die *in vitro* Studien von Schlienger *et al.* hervor, in denen KLH eines anderen Herstellers verwendet wurde (PerImmune, ebenfalls 25 µg/ml). In diesen Studien blieb sowohl die Expression kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche der moDCs nach deren Stimulation mit KLH als auch eine primäre T-Zell-Reaktion auf das Immunogen nach siebentägiger Kokultivierung der KLH-stimulierten moDCs mit autologen CD4⁺ T-Zellen (1:10) aus (Schlienger *et al.*, 2000). Die Ergebnisse dieser Studie entsprechen somit denen der vorliegenden Arbeit für das KLH von Merck.

Es blieb zu klären, warum die KLHs von Pierce und Merck, im Gegensatz zum KLH von Sigma, keinen Einfluss auf die Aktivierung der DCs hatten. Eine mögliche Erklärung wäre eine nicht erfolgte Antigenaufnahme. Zwar zeigen die Ergebnisse zur Endozytosefähigkeit der moDCs, dass diese Zellen prinzipiell in der Lage sind Fremdproteine zu endozytieren, dennoch könnte das Protein (KLH) an sich für eine nicht erfolgte Antigenaufnahme ursächlich sein. KLH enthält eine hohe Anzahl an Glykanstrukturen wie beispielsweise Mannose und Fucose (Stoeva *et al.*, 1999; Wirguin *et al.*, 1995; Wuhler *et al.*, 2004). Diese Strukturen vermitteln die Antigenaufnahme und -prozessierung über den C-Typ-Lektin-Rezeptor DC-SIGN (CD209) auf der Oberfläche von DCs und sind für die Aktivierung dieser Zellen und die Antigenpräsentation von Bedeutung (Figdor *et al.*, 2002; Presicce *et al.*, 2008). Lebrec und Kollegen stellten die Hypothese auf, dass diese Glykanstrukturen durch den Herstellungsprozess der jeweiligen KLH-Präparate verändert werden oder verloren gehen könnten und sich dies wiederum negativ auf die Aktivierung der DCs auswirkt (Lebrec *et al.*, 2014). *In vivo* Studien an Ratten, in denen die Immunogenität unterschiedlicher KLH-Präparate untersucht und miteinander verglichen wurde, belegten jedoch bereits in der Vergangenheit die Induktion einer primären

Immunreaktion auf das KLH der Firma Pierce. In diesen Studien wurden Ratten mittels subkutaner Injektion an Tag 1 (Induktion einer Primärreaktion) und Tag 22 (Induktion einer Sekundärreaktion; *Challenge*) mit den KLH-Präparaten, ohne zusätzliches Adjuvans, immunisiert. Im Gegensatz zu den *in vitro* Studien der vorliegenden Arbeit zeigte sich in diesen *in vivo* Experimenten bereits in der Primärreaktion auf das Pierce-KLH eine anti-KLH Antikörperproduktion an Tag 8, welche in der Sekundärantwort weiter anstieg (Lebrec *et al.*, 2014). Da dieser Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten höchstwahrscheinlich eine DC-abhängige T-Zell-Aktivierung vorausging, entkräften diese Studien die Hypothese, dass veränderter Proteinstrukturen des Pierce-KLHs zu einer möglicherweise nicht stattgefundenen Antigenaufnahme geführt haben könnten. Eine wahrscheinlichere Erklärung für die Unterschiede in der Aktivierung der moDCs in Abhängigkeit vom verwendeten KLH-Stimulus sind proinflammatorische Komponenten wie endotoxische Verunreinigungen innerhalb des KLHs von Sigma. Diese fungieren als PAMP und können DCs aktivieren und zur Reifung stimulieren. Die Induktion kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche der DCs nach deren Stimulation und die Konzentrationsabhängigkeit der induzierten Reaktionen könnten Indizien dafür sein. Zugleich ist es möglich, dass diese *Danger*-Signale mögliche spezifische Reaktionen maskieren. *In vivo* Studien am Kaninchen zeigten bereits, dass nicht aufgearbeitetes KLH im Vergleich zu einer hoch aufgereinigten Variante immunogener ist (Herscowitz *et al.*, 1972). Eine Analyse der verschiedenen KLH-Präparate auf ihren Endotoxingehalt mittels des Monozyten-Aktivierungstests bestätigte diese Vermutung. Lediglich das KLH von Sigma enthielt Endotoxine in einer Konzentration, die über dem systembedingten oberen Detektionslimit lag ($> 2,1$ EU/ml). Möglicherweise könnten auch die divergierenden Ergebnisse bereits veröffentlichter *in vitro* Studien hierauf zurückzuführen sein. Um diese Hypothese zu untersuchen, könnte zuvor aufgereinigtes Sigma-KLH mittels dieses *in vitro* Kokultursystems auf sein Potenzial zur Induktion primärer Immunreaktionen analysiert und mit dem des unbehandelten Sigma-KLHs verglichen werden.

Zusammenfassend wurde in dieser sechstägigen *in vitro* Kokultur von frisch generierten, antigenstimulierten moDCs mit autologen CD4⁺ T-Lymphozyten gezeigt, dass Sigma-KLH die Expression kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche der moDCs induziert. Diese veränderte Expression korreliert mit der Fähigkeit dieser Zellen zur Induktion einer primären Immunreaktion auf das Antigen in Form einer T-Zell-Aktivierung und -Proliferation. Die KLHs von Merck und Pierce hingegen beeinflussten das Oberflächenmarkerprofil der moDCs und infolgedessen den Aktivierungsstatus kokultivierter T-Lymphozyten nicht. Um primäre Reaktionen auf die endotoxinfreien KLHs herausstellen zu können, bedarf es möglicherweise einer zusätzlichen mitogenen Stimulation durch ein *Danger*-Signal.

Reaktionen der kokultivierten Zellen auf das Immunogen KLH bei zusätzlicher Aktivierung durch LPS

Da eine alleinige Stimulation der moDCs mit Merck- und Pierce-KLH das Expressionsprofil dieser Zellen nicht beeinflusste, wurde in einem weiteren Versuchsansatz der Einfluss eines zusätzlichen inflammatorischen Stimulus als sogenannter *Bystander* der antigenen Reaktion untersucht. Hierzu wurden der Stimulation mit den verschiedenen KLHs (25 µg/ml) niedrig gewählte Konzentrationen LPS (0,2 µg/ml), ein Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, zugesetzt. Ziel war es, mit diesem *Danger*-Signal die primäre Immunreaktion anzustoßen bzw. zu verstärken, indem DCs zur Präsentation antigenen Peptide an CD4⁺ Zellen sowie zur gesteigerten Expression kostimulatorischer Moleküle aktiviert wurden. Die Verwendung von *Bystandern* ist in der Immunologie eine gängige Methode, um *in vitro* eine Reaktion auf ein Antigen zu verstärken und die *in vivo* Reaktionen widerzuspiegeln (Delluc *et al.*, 2011; Millard *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2015; Peters *et al.*, 2010; Schlienger *et al.*, 2000). Schlienger und Kollegen stellten die Notwendigkeit eines *Bystanders*, in diesem Fall TNF-α, für die Induktion einer CD4⁺ T-Zell-Reaktion auf ein Neoantigen wie KLH heraus. Während KLH-gepulste moDCs in einer siebentägigen Kokultur mit autologen CD4⁺ T-Zellen keine Proliferation der T-Lymphozyten initiierten, wurde diese primäre Reaktion durch eine zusätzliche TNF-α-Stimulation der KLH-gepulsten moDCs induziert. Allerdings erfolgte hier keine Differenzierung zwischen den Reaktionen auf das Antigen und den Reaktionen auf TNF-α (Schlienger *et al.*, 2000).

Die Analyse der Oberflächenmarkerexpression der moDCs in der vorliegenden Arbeit bestätigte, dass eine kombinierte Stimulation dieser Zellen mit KLH und LPS zur Reifung der moDCs führt. Durch die Bindung von LPS an den TLR4 (Hoshino *et al.*, 1999; Schwartz, 2001) konnte eine erhöhte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD83 und CD86 induziert werden (Mattern *et al.*, 1998). Dieser Effekt wurde unabhängig vom eingesetzten KLH (Sigma, Merck, Pierce, Pierce dialysiert) beobachtet. Der größte Einfluss wurde auf den Reifungsmarker CD83 ausgeübt. Anders als bei den Studien mit alleiniger KLH-Stimulation, unterschieden sich die durch die KLHs von Merck und Pierce (+/- Dialyse) ausgelösten Expressionen nicht mehr signifikant von denen des Sigma-KLHs. Im Vergleich zu einer alleinigen KLH-Stimulation löste Sigma-KLH in Kombination mit LPS die geringsten Veränderungen im Markerprofil aus. Diese Erkenntnis untermauert die Ergebnisse des Endotoxintests: Sigma-KLH allein hatte aufgrund seines hohen Anteils endotoxischer Komponenten bereits eine aktivierende Wirkung auf DCs, die durch eine zusätzliche LPS-Stimulation nur minimal verstärkt werden konnte. In Kombination mit den KLHs von Merck und Pierce hingegen übte LPS einen zusätzlichen endotoxischen Effekt auf die DCs aus und aktivierte diese verstärkt zur Expression kostimulatorischer Moleküle. Da mit diesem kombinierten Stimulus aus Antigen und *Bystander* / *Danger*-Signal eine möglicherweise zuvor

nicht sichtbare antigene Reaktion verstärkt werden sollte, war es von besonderer Wichtigkeit die antigene Reaktion auf KLH von der inflammatorischen Reaktion der Zellen auf den *Bystander* abzugrenzen. Aufgrund dessen erfolgte zeitgleich eine Analyse der DCs nach alleiniger Aktivierung mit LPS. Hätte eine kombinierte Stimulation der Zellen mit Antigen und *Bystander* eine Verstärkung der antigenen Reaktion bewirkt, wäre ein additiver Effekt auf die Zellen zu erwarten gewesen, der den Effekt durch eine alleinige *Bystander*-Stimulation übersteigt. Einen solchen synergistischen Effekt auf die Aktivierung von moDCs von Hämophilie A-Patienten zeigten die *in vitro* Studien von Miller *et al.*: Eine 24-stündige Stimulation der moDCs mit LPS (0,1 µg/ml) und dem Blutgerinnungsfaktor VIII (FVIII) resultierte in einer ausgeprägteren DC-Aktivierung als eine Behandlung mit den einzelnen Stimuli (Miller *et al.*, 2015). Die in den vorliegenden Experimenten detektierten Reaktionen spiegelten jedoch hauptsächlich die Stimulation durch LPS wider und ließen keine Abgrenzung einer antigenen Reaktion zu. Lediglich die Expression des Reifungsmarkers CD83 lag nach einer kombinierten Stimulation der DCs mit KLH (insbesondere Sigma- und Merck-KLH) und LPS über der nach alleiniger LPS-Stimulation. Obwohl dieser Unterschied im Expressionsgrad zwischen beiden Ansätzen aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant ist, besteht die Möglichkeit, dass dieser den antigenen Effekt widerspiegelt. Miller *et al.* zeigten, dass sich der synergistische Effekt bei moDCs vor allem in der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD83 und CD86 manifestierte (Miller *et al.*, 2015). Um die Auswirkung dieser Beobachtung auf eine induzierte T-Zell-Reaktion zu untersuchen, wurden anschließend die T-Zell-stimulatorischen Fähigkeiten von LPS-stimulierten, KLH-stimulierten sowie KLH + LPS-stimulierten DCs analysiert und miteinander verglichen. Hierzu wurden die KLHs von Merck und Sigma verwendet. Eine zusätzliche Stimulation mit LPS führte auch bei den Endpunkten der T-Zell-Aktivierung dazu, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Merck- und Sigma-KLH-induzierten Reaktionen der Zellen mehr verzeichnet wurden. Beim kombinierten Stimulus mit Merck-KLH induzierte LPS, infolge der hochregulierten kostimulatorischen Moleküle auf den moDCs, eine stärkere T-Zell-Proliferation und CD25-Expression als das Antigen von Merck alleine. Die T-Zell-Aktivierung lag hier erstmals deutlich über der Aktivierung in der Kontrollkultur. Dennoch war der Grad der T-Zell-Aktivierung vergleichbar mit dem nach Kokultivierung von LPS-gereiften moDCs mit autologen T-Zellen. Bei Sigma-KLH-stimulierten moDCs hatte die zusätzliche Stimulation mit LPS und die dadurch leicht erhöhte Expression kostimulatorischer Moleküle auf ihrer Oberfläche keine weiteren Auswirkungen auf die Aktivierung der T-Lymphozyten. Folglich konnte in keinem Ansatz ein synergistischer Effekt durch das *Danger*-Signal (LPS) detektiert werden. Ursächlich hierfür könnte die gewählte LPS-Konzentration sein. Studien ergaben, dass ein erfolgreicher *Bystander*-Effekt stark vom gewählten *Bystander* und seiner Konzentration abhängt. So zeigten Miller *et al.*, dass eine LPS-Konzentration von 0,1 µg/ml ein effektiveres *Danger*-Signal darstellte als niedriger (0,01 µg/ml) oder höher (1 µg/ml) gewählte

Konzentrationen (Miller *et al.*, 2015). Zwar ist die hier eingesetzte LPS-Konzentration von 0,2 µg/ml mit der in den Experimenten von Miller und Kollegen vergleichbar, jedoch unterscheiden sich die Versuche in den eingesetzten Antigenen. Es ist anzunehmen, dass eine *Bystander*-Konzentration für jedes individuelle Antigen sowie jede Antigenkonzentration titriert werden muss, um optimale Reaktionen zu erzielen und zwischen antigenen und inflammatorischen Effekten differenzieren zu können (Goodier und Londei, 2001). Für die vorliegenden Experimente würde möglicherweise eine niedrigere Dosis des *Bystanders* den LPS-induzierten Effekt verringern und den KLH-induzierten Effekt herausstellen. Alternativ könnte ein weniger potenter *Bystander* wie TNF-α verwendet werden (Schlienger *et al.*, 2000). Zudem ist zu beachten, dass sich die Dosis eines *Bystanders* nicht nur auf den Aktivierungsstatus der DCs auswirkt, sondern auch Einfluss auf die durch DCs sezernierten Zytokine hat. Diese wiederum beeinflussen den Effektorzelltyp, zu dem sich naive CD4⁺ T-Zellen nach ihrer Aktivierung differenzieren (Peters *et al.*, 2010).

Reaktionen der kokultivierten Zellen auf das Immunogen OVA

In einem weiteren Versuchsansatz wurde mit diesem *in vitro* Kokultursystem die primäre Immunreaktion auf das Modell-Antigen OVA untersucht. Auch diese Experimente wurden mit OVAs von unterschiedlichen kommerziellen Quellen durchgeführt. Hierbei handelte es sich um das OVA der Firma Sigma-Aldrich und das hochreine OVA der Firma Hyglos (Endotoxingehalt: < 0,1 EU/mg).

Wie auch in den Experimenten mit KLH brachte eine 48-stündige Stimulation der *in vitro* generierten moDCs mit OVA verschiedener Hersteller in Konzentrationen von 1 – 100 µg/ml deutliche Unterschiede in der Expression der einzelnen Oberflächenmarker hervor. Unabhängig von der eingesetzten Konzentration hatte das hochreine OVA der Firma Hyglos keinen Einfluss auf die Expression der Oberflächenmarker der moDCs. Das OVA von Sigma hingegen induzierte eine deutliche, konzentrationsabhängige Zunahme der Expression der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD80 und CD83 sowie von HLA-DR. Für CD86 ließ sich eine geringfügige Zunahme verzeichnen. Die CD209-Expression nahm konzentrationsabhängig ab. Der Einfluss der verschiedenen OVA-Präparate auf den Aktivierungsstatus der stimulierten moDCs spiegelte sich in der Fähigkeit dieser Zellen zur T-Zell-Stimulation nach sechstägiger Kokultivierung wider. Sigma-OVA-stimulierte moDCs aktivierten die kokultivierten CD4⁺ T-Lymphozyten konzentrationsabhängig zur Proliferation und Expression des Aktivierungsmarkers CD25. Analog zur ausbleibenden Primärreaktion auf Merck-KLH (Kap. 3.1.4.1) hätte aufgrund der fehlenden Aktivierung Hyglos-stimulierter moDCs auch hier eine ausbleibende Induktion primärer T-Zell-Reaktionen erwartet werden können. Wider Erwarten induzierten Hyglos-OVA-stimulierte moDCs T-Zell-Proliferationen, die mit zunehmender OVA-Konzentration abnahmen und erst bei maximaler Konzentration im Bereich

der Negativkontrolle lagen. Aufgrund der hohen Standardabweichung bei niedrigster OVA-Konzentration (0,1 µg/ml: 5,09 ± 5,09) ist allerdings fraglich, inwieweit es sich tatsächlich um einen spezifischen Effekt handelt. Da der T-Zell-Aktivierungsmarker CD25 in allen Ansätzen unbeeinflusst blieb, kann der Effekt auf die T-Zell-Proliferation vermutlich nicht als solcher gewertet werden, zumal eine erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern auf T-Zellen in der Regel zeitlich der klonalen Expansion vorausgeht (Caruso *et al.*, 1997; Mannering *et al.*, 2002). Wie bereits beim Sigma-KLH, stellte sich auch bei den Sigma-OVA-induzierten Reaktionen die Frage, ob diese auf eine erhöhte Endotoxinkonzentration innerhalb des Präparates zurückzuführen sind. Insbesondere die starke konzentrationsabhängige Zunahme der Effekte ließ dies vermuten (Peters *et al.*, 2010). Der Monozyten-Aktivierungstest zur Analyse des Endotoxingehaltes bestätigte dies: Sigma-OVA enthielt Endotoxine, deren Konzentration über dem systembedingten oberen Detektionslimits lag (> 2,1 EU/ml), wohingegen sich die Reinheit des OVAs von Hyglos bestätigte. Auch Peters und Kollegen quantifizierten in ihren Studien die endotoxische Kontamination von OVA-Präparaten unterschiedlicher kommerzieller Quellen, wobei sich das OVA der Firma Sigma als das mit dem höchsten Endotoxingehalt herausstellte (10 ng LPS/1 mg OVA) (Peters *et al.*, 2010).

Es lässt sich zusammenfassen, dass es mit dem *in vitro* Modell einer sechstägigen Kurzzeit-Kokultur von antigenstimulierten moDCs mit autologen CD4⁺ T-Lymphozyten nicht möglich war primäre Immunreaktionen auf die hochreinen Modell-Antigene KLH und OVA abzubilden. Lediglich endotoxisch kontaminierte Proteinpräparate waren in der Lage, die immunkompetenten Zellen zu aktivieren und eine Immunreaktion zu induzieren. Da es mit den Endpunkten der Expression von Zelloberflächenmarkern und der T-Zell-Proliferation jedoch nicht möglich war, eine antigenspezifische Reaktion von einer unspezifischen, inflammatorischen Reaktion abzugrenzen, eignen sich die kontaminierten Präparate nicht zur Untersuchung antigenspezifischer Reaktionen. Die Ergebnisse der vorliegenden Experimente zur unterschiedlichen Immunogenität einzelner kommerziell erhältlicher Präparate verdeutlicht die Schwierigkeit bei der Interpretation veröffentlichter, immuntoxikologischer Daten. Bei Verwendung reiner Antigene und eines zusätzlichen inflammatorischen Stimulus als *Bystander* ließe sich durch die Verwendung geeigneter Kontrollen (alleinige Stimulation mit *Bystander*) ein antigener Effekt von dem Effekt durch den *Bystander* abgrenzen. Die Titration optimaler *Bystander*-Konzentrationen in Abhängigkeit vom zu untersuchenden Antigen, die Konzentration des Antigens und dessen kommerzielle Quelle stellen hierbei allerdings eine komplexe, zeitintensive Herausforderung dar.

Eine weitere Möglichkeit, die genannten Reaktionen voneinander abzugrenzen, ist die Analyse anderer Endpunkte wie beispielsweise die Produktion antigenspezifischer Antikörper durch B-Lymphozyten. Dies würde die Spezifität der Reaktion belegen, da diese Antikörper nur nach erfolgreicher Initiierung einer spezifischen Immunreaktion detektiert werden könnten. Allerdings

würde dies weitere Zelltypen (B-Lymphozyten) innerhalb der Kokultur voraussetzen und die Komplexität des *in vitro* Systems erhöhen. Eine Alternative ist die Analyse sezernierter Zytokine. Beim Einsatz eines *Bystanders* können die antigenen Effekte jedoch auch hier von den inflammatorischen maskiert werden. Dennoch ist anzunehmen, dass eine Analyse des induzierten Zytokinprofils während der Kokultur einen sensitiveren Endpunkt darstellt als die Analyse von Zelloberflächenmolekülen und T-Zell-Proliferation. Darüber hinaus könnten antigenspezifische T-Zell-Reaktionen durch wiederholten Kontakt mit einem bereits bekannten Antigen amplifiziert werden und die Analyse sekundärer Immunreaktionen ermöglichen. So wurde die Kurzzeit-Kokultur, welche lediglich eine Analyse der Reaktionen nach *Priming* mit dem jeweiligen Antigen ermöglichte, zu einer 16-tägigen Kokultur mit zweimaliger Restimulation (*Challenge*) erweitert. Der Fokus der Analyse lag hier auf der induzierten Zytokinsekretion.

4.1.3 Sekundärantwort auf das Modell-Antigen KLH *in vitro*

Oftmals erfolgt eine Detektion antigenspezifischer Reaktionen erst nach mehrmaligen Restimulationszyklen in Form einer sekundären Immunreaktion. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine 16-tägige Kokultur von moDCs und autologen CD4⁺ T_H-Zellen mit zweimaliger Restimulation (*Challenge*) der kultivierten Zellen an Tag 7 und 14 herangezogen, um den Prozess der antigenspezifischen T-Zell-Aktivierung im Rahmen einer Sekundärantwort zu untersuchen. Aufgrund seiner Reinheit wurde für diese Ansätze das KLH der Firma Merck verwendet. Da durch die Kokultivierung von T-Lymphozyten mit KLH-stimulierten moDCs das *Priming* der naiven T-Zellen mit dem Antigen KLH bereits stattfand, wurde durch eine Restimulation dieser Zellen mit dem gleichen Antigen eine Erhöhung der induzierten Reaktionen erwartet. Dass Restimulationen *in vitro* das Ausmaß von Zytokinausschüttungen amplifizieren können, wurde bereits in vergangenen Studien gezeigt (Giese *et al.*, 2010). Auch bei den hier durchgeführten *in vitro* Experimenten zeigte sich eine gesteigerte, KLH-induzierte Sekretion der Zytokine IL-2, IFN- γ , IL-10, IL-6 und TNF- α nach erfolgter Restimulation. Vergleichbare Ergebnisse zur Induktion antigenspezifischer T-Zell-Reaktionen nach Restimulation erzielten Studien an einem humanen artifiziellen Lymphknoten (*human artificial lymph node*; huALN), einem miniaturisierten Bioreaktor, der die Kokultivierung verschiedener Zelltypen in einer dreidimensionalen Matrix ermöglicht (Giese *et al.*, 2010). Trotz des unterschiedlichen Ausmaßes der Sekretion einzelner Zytokine, erreichten alle induzierten Zytokinsekretionen 24 Stunden nach erfolgter Restimulation ihre maximalen Konzentrationen und sanken anschließend wieder auf ihr Ausgangslevel. Dies ist auf den täglichen Mediumwechsel (30 % des Gesamtvolumens) zurückzuführen, der zu einer Verdünnung der Zytokinkonzentrationen im Well führte.

Eine frühe T-Zell-Aktivierung konnte in Form einer hohen IL-2-Sekretion zu Beginn der Kultur an Tag 1 detektiert werden, die im zeitlichen Verlauf wieder abnahm. Diese Beobachtung wird von den Studien am huALN bestätigt (Giese *et al.*, 2010). IL-2 wird hauptsächlich von aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten sezerniert und spielt als Wachstumsfaktor in der Aktivierung und Proliferation von geprimten T-Lymphozyten eine zentrale Rolle. Der Kontakt mit dem antigenen Peptid auf der Oberfläche der DCs aktiviert die naiven T-Zellen zur IL-2-Sekretion. Dieses Zytokin wiederum stimuliert die T-Zellen zu weiterer Proliferation. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Primärreaktion (Kap. 3.1.4.1) deutet die detektierte IL-2-Sekretion zu Beginn der Kultur darauf hin, dass die T-Lymphozyten durch den Kontakt mit KLH-gereiften moDCs und dem löslichen Antigen zwar zur IL-2-Sekretion aktiviert wurden, diese für eine Induktion ihrer Proliferation jedoch nicht ausreichend war. Ein alleiniger Kontakt mit KLH-gereiften moDCs stellte keinen ausreichenden Stimulus dar, um die kokultivierten T-Lymphozyten zur IL-2-Sekretion zu aktivieren. Erst ein kombinierter Stimulus aus spezifisch gereiften moDCs und löslichem Antigen induzierte eine T-Zell-Aktivierung. Eine Restimulation der Zellen im huALN-Reaktor mit dem spezifischen Antigen an Tag 7 resultierte bei Giese und Kollegen in einer moderaten IL-2-Freisetzung (Giese *et al.*, 2010). Im Vergleich hierzu hatte die Restimulation an Tag 7 der *in vitro* Kokultur der vorliegenden Arbeit keine Auswirkungen auf die IL-2-Sekretion. Möglicherweise war der Zeitpunkt dieser ersten Restimulation für eine abermalige Aktivierung der T-Lymphozyten in einer zweidimensionalen Kultur nicht optimal gewählt, sodass die T-Zellen noch nicht zu weiterer IL-2-Sekretion fähig waren, oder der Stimulus war nicht ausreichend, sodass die T-Zellen in den anergen Zustand wechselten. Dass der überwiegende Anteil der T-Zellen weiterhin vital war, wurde durch die Restimulation an Tag 14 belegt, die zu einer gesteigerten IL-2-Sekretion führte. Die detektierten Sekretionen der Zytokine IFN- γ , IL-10, IL-6 und TNF- α widerlegen die Vermutung, dass lediglich das lösliche Antigen, nicht aber eine Interaktion zwischen moDCs und T-Lymphozyten, für die induzierte T-Zell-Aktivierung verantwortlich sein könnte. Bereits eine alleinige Restimulation der kokultivierten T-Zellen mit KLH-gereiften moDCs erhöhte die Sekretion dieser Zytokine. Eine Stimulation mit zusätzlichem löslichen KLH induzierte ein über die Zeit vergleichbares Sezernierungsmuster, jedoch in meist deutlich höheren Konzentrationen.

Bei IFN- γ handelt es sich um ein Typ-II-Interferon, welches insbesondere von aktivierten T-Lymphozyten produziert wird. Dies wird anhand der gemessenen IFN- γ -Konzentrationen im Rahmen der Kokultur deutlich. Bereits nach erstem Kontakt von KLH-gereiften moDCs mit CD4⁺ T-Zellen wurde ab Tag 1 der Kokultur eine IFN- γ -Sekretion induziert, die im zeitlichen Verlauf bis zur ersten Restimulation weiter anstieg. Eine erste Restimulation an Tag 7 erhöhte diese Ausschüttung weiter, wobei die IFN- γ -Sekretion im Fall der zellbasierten Restimulation (KLH-gereifte moDCs) über der Sekretion nach vollständiger Restimulation (KLH-gereifte moDCs + lösliches KLH) lag. In beiden Ansätzen wurde diese IFN- γ -Sekretion durch eine

zweite Restimulation nochmals deutlich übertroffen. Die starke Induktion, insbesondere nach zweiter Restimulation, könnte auf eine Differenzierung der naiven T-Lymphozyten zu antigenspezifischen Effektorzellen hindeuten.

Während die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF- α nach zweiter Restimulation an Tag 14 die Sekretion nach erster Restimulation an Tag 7 in ihren Konzentrationen deutlich überstieg, zeigte die IL-10-Sekretion ein gegensätzliches Muster. Hier wurde die maximale Sekretion bereits nach erster Restimulation erreicht. Bei IL-10 handelt es sich um ein antiinflammatorisches Zytokin, das unter anderem von DCs und aktivierten T-Zellen sezerniert wird. Es limitiert die Effektorfunktionen von Makrophagen und DCs auf T-Zellen und ist in der Lage, die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen zu inhibieren (Saraiva und O'Garra, 2010). So könnte die hohe IL-2-Konzentration ab Tag 1 der Kultur zu einer Aktivierung dieses Feedback-Mechanismus geführt haben, wodurch IL-10 ab Tag 1 in kontinuierlich ansteigender Konzentration von den Zellen produziert wurde (Taga und Tosato, 1992). Als Reaktion auf die Induktion weiterer proinflammatorischer Mediatoren stieg die IL-10-Konzentration durch eine erste Restimulation schließlich nochmals drastisch an. Warum nach zweiter Restimulation keine weitere Erhöhung der IL-10-Konzentration detektiert wurde, obwohl zu diesem Zeitpunkt maximale Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine (IL-2, IFN- γ , TNF- α) freigesetzt wurden, könnte auf ein Überschreiben der antiinflammatorischen Reaktion zurückzuführen sein.

IL-6 zeigte über die Zeit ein mit IL-10 vergleichbares Sezernierungsprofil. IL-6 wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen produziert und ist an der Induktion von IL-2, der IL-2-R-Expression (CD25) sowie an der Proliferation und Differenzierung von T-Lymphozyten beteiligt (Hirano 1998; van Snick 1990). Die erhöhte IL-6-Konzentration nach erster Restimulation könnte folglich Einfluss auf die IL-2 Sekretion bei der zweiten Restimulation gehabt haben.

Eine Sekretion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α wurde bereits zu Beginn der Kultur an Tag 1 detektiert. Die anschließende Abnahme der sezernierten TNF- α -Konzentration bis zum Tag der ersten Restimulation auf 0,00 pg/ml könnte darauf schließen lassen, dass es sich bei der Sekretion zu Beginn der Kultur um eine anfängliche, stressinduzierte Reaktion handelte. Die Restimulationen mit KLH-gereiften moDCs und löslichem KLH resultierten auch bei TNF- α in deutlich erhöhten Ausschüttungen. Da TNF- α neben Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und NK-Zellen auch von T-Lymphozyten infolge ihrer Aktivierung sezerniert werden kann (Lorré *et al.*, 1992), könnte die erhöhte TNF- α -Ausschüttung nach Restimulation auch hier die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen widerspiegeln. Gestützt wird diese Annahme dadurch, dass die TNF- α -Ausschüttung nach zweiter Restimulation die Ausschüttung nach erster Restimulation in ihrer Konzentration deutlich überstieg.

Somit ermöglichten die Restimulationszyklen der erweiterten Kokultur von CD4⁺ T-Zellen und autologen, KLH-gereiften moDCs eine Amplifikation der induzierten antigenspezifischen T-Zell-Reaktionen. In Übereinstimmung mit der ausbleibenden T-Zell-Proliferation in den vorangegangenen Experimenten zur Primärreaktion (Kap. 3.1.4.1), induzierte das *Priming* der naiven T-Lymphozyten mit Merck-KLH kaum Reaktionen im Zytokinprofil. Eine Restimulation hingegen resultierte in einer deutlich gesteigerten Sekretion aller dargestellten Zytokine. Daraus ist zu schließen, dass die T-Zellen als Reaktion auf die Restimulation proliferierten und infolgedessen mehr Zytokine produziert wurden. Da IL-2 und IFN- γ eine wichtige Rolle in der T-Zell-Polarisierung, genauer in der Differenzierung von T_H0-Zellen zu T_H1-Zellen einnehmen, deutet die KLH-induzierte Sekretion dieser beiden Zytokine auf die Induktion einer T_H1-basierten Immunreaktion hin (Abbas *et al.*, 1996; O'Garra, 1998). Dies würde Studien anderer Autoren bestätigen (Millard *et al.*, 2003; Presicce *et al.*, 2008). Obwohl die hohe Sekretion von IL-10 nach Restimulation dagegen zu sprechen scheint, da sie für eine T_H2-basierte Immunreaktion charakteristisch ist, wurde gezeigt, dass IL-10 ebenfalls von humanen T_H1-Zellen produziert werden kann (Del Prete *et al.*, 1993; Sornasse *et al.*, 1996). So lässt die induzierte IL-10-Sekretion keinen eindeutigen Rückschluss auf den Effektorzelltypen zu. Um eine eindeutige Aussage über den Effektortyp der ausdifferenzierten T-Lymphozyten in der Kokultur treffen zu können, müssten weitere Zytokine wie beispielsweise IL-5 (von T_H2-Zellen sezerniert) in die Analyse eingeschlossen werden.

Neben der Analyse des Zytokinprofils wurde mit der finalen Analyse der Zellviabilität mittels PI ein weiterer Parameter hinzugezogen, um die *in vitro* stattgefundenen Reaktionen in der erweiterten Kokultur zu analysieren. Der Nukleinsäureinterkalator PI färbt ausschließlich tote Zellen an. Der Anteil PI-positiver Zellen diene somit als Maß für die Zellviabilität. Es zeigte sich, dass die Kokulturen an Tag 16 (mit KLH-Restimulationen an Tag 7 und 14) einen weitaus höheren Anteil PI-positiver Zellen enthielten als die restimulierten Monokulturen KLH-gereifter moDCs. Zusätzlich entfiel der größte Anteil toter Zellen auf die Population der moDCs (lediglich 1,5 % PI-positive T-Zellen). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass es sich hierbei um eine T-Zell-induzierte Reaktion handeln könnte, über die bisher wenig bekannt ist. Allerdings wurde das Schicksal von DCs von Matsue und Kollegen *in vitro* an murinen Zellen untersucht. Sie konnten anhand der PI-Aufnahme durch die Zellen sowie der Chromatinkondensation zeigen, dass aus der Milz isolierte DCs nach Interaktion mit KLH-spezifischen CD4⁺ T_H1 Klonen *in vitro* in Anwesenheit von KLH in Apoptose gehen. Vergleichbar mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit resultierte die Kokultur bei Matsue und Kollegen ebenfalls in einem deutlich höheren Anteil PI-positiver Zellen (87 %) als eine Monokultur von DCs (46 %) (Matsue *et al.*, 1999). Weitere Studien belegten ebenfalls, dass antigenspezifische T-Zell-Interaktionen mit APCs nicht nur zu einer Aktivierung der T-Lymphozyten, sondern auch zur Apoptose innerhalb der APC-Population führen (Bertho *et al.*, 2002; Lokshin *et al.*, 2002; Setterblad *et al.*, 2004).

Dieser Zelltod ist die Folge eines Austausches bidirektionaler Aktivierungssignale, bei dem insbesondere den MHC II-Molekülen auf APCs eine Schlüsselrolle zugeschrieben wird (MHC II-vermittelte Apoptose) (Bertho *et al.*, 2000; Drénou *et al.*, 1999; Thibeault *et al.*, 1999). Dies bestätigt die Vermutung, dass es sich in der vorliegenden Arbeit bei dem beobachteten Zelltod der moDCs um eine T-Zell-induzierte Reaktion aufgrund einer antigenspezifischen Interaktion dieser beiden Zelltypen handelte. Mit diesem Mechanismus der MHC II-vermittelten Apoptose von DCs kann das Ausmaß der T-Zell-Aktivierung limitiert und eine anhaltende, exzessive Immunreaktion verhindert werden. Dies könnte erklären, warum die Kokultur, die an Tag 14 mit OVA-gereiften moDCs stimuliert wurde, einen geringeren prozentualen Anteil toter moDCs aufwies. Da die T-Lymphozyten dieser Kokultur ab Tag 0 auf KLH geprimt wurden, stellte OVA für diese Zellen ein irrelevantes Antigen dar. Infolgedessen blieb an Tag 14 eine antigenspezifische Interaktion der T-Lymphozyten mit diesen OVA-gereiften moDCs aus, wodurch keine MHC II-vermittelte Apoptose dieser APCs eingeleitet wurde. So fiel der Anteil toter moDCs in dieser Kultur im Vergleich zur Kokultur mit zweimaliger KLH-Restimulation niedriger aus. Hier wäre eine zusätzliche Analyse der T-Zell-Aktivierung, z.B. in Form induzierter Zytokinsekretionen, von Interesse. Auch diese sollte bei Stimulation mit einem irrelevanten Antigen im Vergleich niedriger ausfallen. Um wie auch beim Merck-KLH, die Detektion rein antigenen Reaktionen zu gewährleisten, müsste dieser Ansatz (anders als in der bereits durchgeführten erweiterten Kokultur) mit pyrogenfreiem OVA als irrelevantem Antigen durchgeführt werden. Darüber hinaus würde eine Charakterisierung der Art des Zelltodes weiter Aufschluss über die stattgefundenene Reaktion geben. Hier würde beispielsweise eine ergänzende Färbung mit Annexin V oder eine Analyse der Caspase-3-Aktivierung zur Unterscheidung apoptotischer und nekrotischer Zellen dienen.

Für das hochreine Modell-Antigen KLH ließ sich im *in vitro* Kokultursystem keine primäre Immunreaktion abbilden, wohl aber eine Sekundärantwort nach Restimulation. In einem weiteren Versuchsansatz wurde untersucht, inwieweit solch ein Modell zur Untersuchung primärer Reaktionen auf therapeutische mAk geeignet ist. Hierzu wurden therapeutische mAk mit bekanntem klinischen Potenzial zur Induktion einer ADA-Produktion im Patienten *in vitro* untersucht.

4.1.4 Primärantwort auf therapeutische monoklonale Antikörper *in vitro*

Neben ihrer hochspezifischen Wirkung haben mAk das Potenzial im Menschen unerwünschte Immunreaktionen auszulösen, wie die Produktion von ADAs durch Plasmazellen. Da diese Reaktionen auf einen T-Zell-abhängigen Mechanismus zurückzuführen sein können, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit primäre T-Zell-Reaktionen auf unterschiedliche mAk untersucht.

Für diese Experimente wurde zunächst OKT3, ein gebräuchliches Analogon des therapeutischen, immunsuppressiven mAk Muromonab (Orthoclone OKT3®), als Positivkontrolle etabliert. Aufgrund seines murinen Ursprungs weist Muromonab im Menschen eine starke Immunogenität auf, die zu einer massiven humoralen Reaktion in Form einer Produktion neutralisierender anti-murin-IgG Antikörper führt und die Anwendung dieses mAk ohne zusätzliche Immunsuppressiva heutzutage ausschließt (Goldstein, 1987; Thistlethwaite *et al.*, 1988). Auch in den durchgeführten Experimenten induzierte OKT3 deutliche T-Zell-Reaktionen in der *in vitro* Kokultur. Auf das Oberflächenmarkerprofil der moDCs vor Beginn der Kokultur hatte dieser murine mAk jedoch keinen Einfluss. Da es sich bei OKT3 um ein sauberes Protein handelt, welches folglich für DCs kein *Danger*-Signal darstellt, war eine erhöhte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 sowie des Reifungsmarkers CD83 nicht zu erwarten gewesen. Aufgrund des fehlenden *Danger*-Signals wurde CD209, ein C-Typ-Lektin-Rezeptor (PRR), der die Antigenaufnahme von DCs vermittelt, weiterhin exprimiert. So kann vermutet werden, dass eine Aufnahme des Antigens stattfinden konnte. Da HLA-DR *per se* auf *in vitro* generierten moDCs exprimiert wurde (Kap. 3.1.1), besteht trotz ausbleibender Erhöhung der Expression die Möglichkeit, dass eine Präsentation des aufgenommenen Antigens stattfinden konnte. Dies belegte auch der Kokulturansatz, in dem lediglich OKT3-behandelte moDCs mit autologen T-Lymphozyten, ohne zusätzliche Gabe von OKT3 in löslicher Form zum Start der Kokultur, kultiviert wurden. Bereits hier wurde eine T-Zell-Aktivierung in Form einer gesteigerten Proliferation sowie CD25-Expression induziert. Stärker fielen die Reaktionen bei zusätzlicher Stimulation mit löslichem OKT3 zum Start der Kokultur aus, insbesondere im Fall der CD25-Expression. Inwieweit es sich hierbei um Reaktionen auf den murinen Ursprung des mAks handelt, oder ob die induzierten Reaktionen lediglich auf seine Spezifität als anti-CD3 Antikörper zurückzuführen sind, ist fraglich. Reaktionen auf ein Fremdprotein würden eine klassische Immunreaktion voraussetzen, die wiederum die zusätzliche Expression kostimulatorischer Moleküle auf APCs als zweites Aktivierungssignal benötigt. Dass die Expression dieser Moleküle durch eine Stimulation der moDCs mit OKT3 vor dem Start der Kokultur nicht beeinflusst wurde, spricht gegen die Theorie einer Reaktion allein auf die murinen Anteile dieses mAks. Muromonab führt durch die Bindung seines Targetantigens auf T-Zellen, bei zeitgleicher Kreuzvernetzung durch FcRs, zu einer verstärkten Zellaktivierung der T-Lymphozyten (Cole *et al.*, 1997; Tax *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2000). Dass eine alleinige Bindung von OKT3 an CD3⁺ T-Lymphozyten diese Zellen ohne zusätzliche Kreuzvernetzung von OKT3 durch FcR-exprimierende Zellen nicht aktiviert, wird durch die Ergebnisse der stimulierten T-Zell-Monokulturen belegt und stimmt mit bereits früh veröffentlichten Studien überein (Schwab *et al.*, 1985). Wahrscheinlicher ist somit, dass die induzierten T-Zell-Reaktionen in den Ansätzen mit zusätzlichem, löslichem OKT3-Stimulus die Folge einer direkten Bindung von OKT3 durch T-Zellen und zusätzlicher Kreuzvernetzung durch

FcRs der kokultivierten moDCs waren. Der Einfluss der xenogenen Anteile von OKT3 auf die detektierten Reaktionen ist dennoch nicht gänzlich auszuschließen, auch wenn der Anteil antigenspezifischer T-Zell-Aktivierungen vermutlich sehr gering war. Die Bindung der FcRs durch die Fc-Domäne des mAk und die Kreuzvernetzung durch die gleichzeitige Bindung des Paratops dieses mAk an das Epitop auf den T-Lymphozyten könnte möglicherweise zu einer nachträglichen Aktivierung der moDCs in Form einer erhöhten Expression kostimulatorischer Moleküle geführt haben. Folglich könnten die moDCs zu einem späteren Zeitpunkt der Kultur in der Lage gewesen sein, spezifische Reaktionen auf das murine Protein zu induzieren. Die Aktivierung der moDCs im Verlauf bzw. am Ende der Kokultur wurde in den vorliegenden Studien jedoch nicht analysiert. Auch in den Ansätzen ohne Zugabe von löslichem OKT3 besteht die Möglichkeit, dass eine anfängliche Aktivierung der T-Zellen durch die Bindung von OKT3 induziert wurde. Dieser Antikörper könnte bereits bei Stimulation der moDCs über seine Fc-Region an die FcRs der Zellen gebunden und die T-Lymphozyten nach Einbringen der moDCs in die Kokultur aktiviert haben. Möglicherweise wurden auch hier die moDCs während der Kokultur durch die Kreuzvernetzung zunehmend aktiviert, was eine klassische Immunreaktion in Gang gesetzt haben könnte. Das niedrigere Aktivierungslevel der T-Zellen im Vergleich zur Kokultur mit zusätzlichem, löslichem OKT3-Stimulus, insbesondere bei der CD25-Expression, ist vermutlich auf die fehlende direkte Bindung frei verfügbarer OKT3-Moleküle zurückzuführen. Besonders auffällig bei der Betrachtung der Ergebnisse zur T-Zell-Aktivierung nach OKT3-Stimulation sind zudem die stark variierenden Reaktionsstärken der einzelnen Donoren. Dies veranschaulicht die Problematik der Inter-Donor-Variabilität, die bei der Analyse *in vitro* induzierter Immunreaktionen besteht. Da die vorliegenden *in vitro* Experimente lediglich ein kleines Zeitfenster einer komplexen immunologischen Reaktion abbilden, ist es nicht möglich für jeden Donor die optimalen Zeitpunkte zu etablieren, um das maximale Ausmaß immunogener Reaktionen zu zeigen. Auch donorspezifische Faktoren wie beispielsweise genetische Polymorphismen oder das Alter spielen eine Rolle.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die primären T-Zell-Reaktionen auf den murinen Ursprung von OKT3 in der sechstägigen Kokultur *in vitro* nicht eindeutig identifiziert werden konnten. Dennoch wurde OKT3 für anschließende Experimente als Positivkontrolle mitgeführt, um eine mögliche Induktion von T-Zell-Aktivierungen zu verifizieren.

Anders verhielt es sich hingegen beim chimären mAk MabThera. Da dieser nicht gegen ein Oberflächenantigen von T-Lymphozyten gerichtet ist, konnte eine induzierte T-Zell-Aktivierung aufgrund seiner Bindungsspezifität ausgeschlossen werden. Infolgedessen handelt es sich bei der T-Zell-Proliferation, die begleitend mit einer Induktion der CD25-Expression bei einem der Donoren detektiert wurde, wahrscheinlich um eine antigenspezifische Reaktion. Zwar zeigten die moDCs dieses Donoren auch hier keine erhöhte Expression kostimulatorischer Moleküle nach Stimulation mit MabThera, dennoch besteht die Möglichkeit, dass der Spender in der

Vergangenheit schon einmal mit gleichen oder ähnlichen antigenen Peptiden in Kontakt gekommen ist. In diesem Fall würden die T-Zell-Populationen dieses Donors bereits antigenspezifische T-Zell-Klone enthalten, die auch bei geringer APC-Aktivität und ausbleibenden *Danger*-Signalen aktiviert werden können. Bei einem weiteren Donor zeigte sich der entgegengesetzte Fall. MabThera induzierte hier zwar eine gesteigerte CD80-Expression, welche allerdings keine T-Zell-Aktivierung zur Folge hatte. Da im Verlauf der *in vitro* Differenzierung von Monozyten zu moDCs und deren Stimulation immer wieder Zelldebris anfällt, der als inflammatorischer Stimulus wirkt, könnte es sich bei der detektierten Induktion der CD80-Expression um eine unspezifische Reaktion der moDCs handeln. Möglicherweise wurde bei den Zellen dieses Donors, im Vergleich zu den Ansätzen mit dem Zellmaterial anderer Donoren, ein höherer Anteil Zelldebris produziert. Dies würde erklären, warum diese Reaktion lediglich bei einem Donor und dort über die gesamte Konzentrationsspanne von MabThera hinweg detektiert wurde. Wäre die erhöhte CD80-Expression hingegen durch beispielsweise vereinzelt auftretende Aggregate in der MabThera-Lösung ausgelöst worden, wäre diese Reaktion nicht über die ganze Konzentrationsspanne hinweg und insbesondere nicht nur bei einem einzelnen Donor aufgetreten. Trotz dieses zweiten kostimulatorischen Signals, das für die Initiierung einer spezifischen T-Zell-Reaktion unerlässlich ist, hatte die Kokultivierung der moDCs mit autologen T-Lymphozyten keine Auswirkung auf den Aktivierungsstatus der T-Zellen. Möglicherweise verfügten nicht ausreichend kokultivierte T-Zellen über einen kompatiblen TCR, um eine spezifische T-Zell-Aktivierung zu induzieren. Handelt es sich beim betreffenden Donor zudem um einen sogenannten *Non-* oder *Low-Responder*, könnte dies ebenfalls zur Erklärung der *in vitro* nicht detektierten T-Zell-Aktivierung beitragen.

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, stellte sich die Abbildung primärer T-Zell-Reaktionen auf die xenogenen Anteile eines mAks *in vitro* in der sechstägigen Kokultur aufgrund fehlender kostimulatorischer Signale als problematisch heraus. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Versuchsansatz analysiert, ob diese kostimulatorischen Signale bereits durch eine unnatürliche Präsentation der antigenen Epitope induziert werden und die primäre Immunreaktion anstoßen bzw. verstärken konnten. *In vivo* sind multiple Mechanismen bekannt, die zu einer Reifung und Aktivierung von DCs führen können. Es wurde gezeigt, dass aktivierende Fc γ Rs (Bánki *et al.*, 2003; Dhodapkar *et al.*, 2005), C1q und andere Produkte der Komplementkaskade effektive Mediatoren der DC-Aktivierung darstellen können (Csomor *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2007). DCs exprimieren Fc γ Rs, die aufgrund ihrer geringen Affinität in der Bindung von monomeren Antikörpern eher ineffektiv sind (Bajtay *et al.*, 2006). Multimere Antikörperkomplexe hingegen sind in der Lage, die Avidität von Fc γ Rs auf DCs zu erhöhen und diese Zellen durch ihre Bindung zu aktivieren. Darüber hinaus sind Aggregate in der Lage, mit Komplementfaktoren wie C1q zu interagieren und die Komplementkaskade zu

aktivieren. Da für die Experimente der vorliegenden Arbeit hitzeinaktiviertes FCS als Mediumzusatz verwendet wurde, ist eine Interaktion von Aggregaten mit Komplementfaktoren zur Aktivierung der moDCs hier nicht relevant. Einen weiteren möglichen Mechanismus stellt die Bindung von repetitiven Sequenzen durch PRRs dar, wodurch eine Aktivierung und Reifung von DCs initiiert werden kann (Gallucci und Matzinger, 2001).

Es galt zu zeigen, dass sich diese durch eine Proteinaggregation gesteigerte Immunogenität auch *in vitro* abbilden lässt. Hierfür wurden die beiden therapeutischen anti-CD20 mAk MabThera (Rituximab; chimär) und Arzerra (Ofatumumab; human) sowie die beiden therapeutischen anti-TNF- α mAk Remicade (Infliximab; chimär) und Humira (Adalimumab; human) sowohl in nativer als auch in aggregierter Form in der sechstägigen Kokultur *in vitro* auf ihr immunogenes Potenzial analysiert. Die artifizielle Aggregation der therapeutischen Proteine wurde durch eine physikalische Denaturierung mittels Hitze erzeugt, die eine unspezifische Zusammenlagerung einzelner Proteinmoleküle zur Folge haben kann. Die DLS-Analyse der mit thermalem Stress behandelten Proben brachte trotz identischer Behandlungsbedingungen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen mAk hervor. Während die thermale Behandlung nahezu keinen Einfluss auf die mAk Arzerra und Humira hatte, stieg der Anteil an Aggregaten in den behandelten Proben von MabThera und Remicade an. Dies wurde anhand einer deutlich erhöhten Polydispersität sichtbar. Bei Remicade verlagerte sich zudem der Hauptpeak der Probe von einem ursprünglichen medianen Rh von 8,7 nm auf 49 μ m. Die hochmolekularen Bestandteile stiegen auf 92,6 % an. Bei MabThera blieben diese Parameter nahezu unbeeinflusst. Dieses unterschiedliche Ausmaß der Aggregatbildung bei den verschiedenen mAk lässt sich möglicherweise auf unterschiedliche intrinsische Eigenschaften dieser Proteine zurückführen. Auch frühere Studien zeigten, dass identische physikalische Bedingungen bei verschiedenen mAk dennoch zu Unterschieden in der Aggregatbildung führen können (Rombach-Riegraf *et al.*, 2014).

Da den Ansätzen der *in vitro* Kokultur zur Analyse der nativen mAk kein artifizieller Reifungsstimulus zugegeben wurde, induzierten diese erwartungsgemäß weder nennenswerte DC- noch T-Zell-Reaktionen. Von den mAk, die dem physikalischen Stress durch Hitze ausgesetzt waren, induzierte lediglich Remicade Reaktionen im *in vitro* DC/T-Zell-Assay. Dieser mAk wies bereits im Rahmen der DLS-Analyse die höchste Polydispersität und den größten Anteil hochmolekularer Bestandteile auf. Auch Rombach-Riegraf und Kollegen generierten in ihren publizierten *in vitro* Studien Aggregate von zwei mAk und stellten heraus, dass der Anteil an Aggregaten in einer Lösung mit ihrem Potenzial zur Aktivierung von moDCs sowie der Bildung von MHC II-Peptid-Komplexen *in vitro* korreliert (Rombach-Riegraf *et al.*, 2014). Verglichen mit den Ergebnissen dieser Studie, in der sich der Einfluss der Aggregate auf den Aktivierungsstatus der moDCs in Form erhöhter CD80-, CD83- sowie CD86-Expressionen zeigte, wurde in den Experimenten der vorliegenden Arbeit lediglich die Expression des

kostimulatorischen Moleküls CD86 beeinflusst. Dies könnte auf einen schwächeren Aktivierungsstimulus durch die generierten Aggregate im Vergleich zum Stimulus in der publizierten Studie zurückzuführen sein. Ein Vergleich der prozentualen Polydispersitäten kann diese Vermutung jedoch nicht bestätigen. Während die Aggregate von Remicade in der vorliegenden Arbeit eine mittlere Polydispersität von 36,8 % aufwiesen (thermaler Stress: 24 Stunden, 55 °C), erreichten die generierten Aggregate bei Rombach-Riegraf und Kollegen (thermaler Stress: 10 Minuten, 65 °C, kombiniert mit zusätzlichem Schütteln bei 1400 rpm) eine Polydispersität von ca. 40 %. Interessanter Weise zeigten die zwei aggregierten mAk der publizierten Studie ebenfalls vergleichbare Polydispersitäten, unterschieden sich jedoch deutlich in ihrer totalen Anzahl an Aggregaten (Resultat einer *Micro-Flow Imaging*-Analyse) und somit auch in ihrem Potenzial zur Aktivierung der moDCs (Rombach-Riegraf *et al.*, 2014). Auch andere Studien zeigten Korrelationen zwischen der Partikelanzahl aggregierter Proben und einer gesteigerten Zellaktivierung (Joubert *et al.*, 2012). Die Polydispersität allein ist folglich nicht ausschlaggebend für eine Charakterisierung von Aggregaten. So können die erzeugten Aggregate von Remicade, trotz vergleichbarer prozentualer Polydispersität, einen deutlich schwächeren Aktivierungsstimulus darstellen als die Aggregate der veröffentlichten Studie von Rombach-Riegraf und Kollegen. Hierfür spricht nicht nur die unterschiedliche Anfälligkeit einzelner mAk zur Aggregatbildung, sondern auch der in den Studien von Rombach-Riegraf *et al.* zusätzlich angewandte Stressfaktor des Schüttelns sowie die längere Stimulationszeit der moDCs (68 – 72 Stunden) mit einer höheren Konzentration des mAks (200 µg/ml). All dies könnte erklären, warum in der vorliegenden Arbeit, anders als in den Studien von Rombach-Riegraf *et al.*, lediglich die Expression von CD86 beeinflusst wurde. Diese CD86-Expression wurde bei vier von sieben Donoren nach Stimulation mit maximaler Konzentration des aggregierten Remicade detektiert. Von diesen Expressionen lagen zwei über einer 1,5-fachen Induktion. Dass die CD86-Expression erst bei maximaler Konzentration beeinflusst wurde kann darauf zurückgeführt werden, dass bei hohen Konzentrationen mehr Proteinmoleküle für eine mögliche Aggregation zur Verfügung stehen. Dies wiederum untermauert die Hypothese, dass eine erhöhte Anzahl an Aggregaten mit einer gesteigerten Zellaktivierung korreliert. Die hohe Variabilität der Reaktionen der moDCs verschiedener Donoren auf das gleiche aggregierte Material wurde auch in anderen Studien beobachtet und kann auf die sehr heterogene Mischung molekularer Produkte in den Antikörperlösungen zurückgeführt werden (Rombach-Riegraf *et al.*, 2014). Hinsichtlich der Ergebnisse der DC-Aktivierung wurden in der Kokultur der vorliegenden Arbeit lediglich bei einem geringen Anteil der getesteten Donoren T-Zell-Aktivierungen erwartet. Die Induktion solcher Reaktionen ist sowohl von der Anwesenheit und Reaktivität epitopspezifischer T-Lymphozyten als auch von den zwei Signalen, die durch die moDCs als APCs bereitgestellt werden abhängig: die Expression kostimulatorischer Moleküle auf ihrer Oberfläche und die Präsentation des MHC II-Peptid-Komplexes, dessen Bildung

wiederum vom Haplotypen jedes individuellen Donoren abhängt. Aufgrund der Abhängigkeit von zahlreichen Faktoren werden starke Reaktionen eher selten induziert (Rombach-Riegraf *et al.*, 2014). In den Experimenten der vorliegenden Arbeit induzierten die moDCs der Donoren mit erhöhter CD86-Expression zwar T-Zell-Proliferationen (Donoren # 3 – 6), die Stärke dieser Reaktionen überschritt eine zweifache Induktion jedoch nicht. Folglich könnte es sich hierbei um antigenspezifische Reaktionen handeln, die aufgrund des geringen Anteils antigenspezifischer T-Zellen in einer *in vitro* Kultur schwach ausfielen. Auffällig ist, dass das Ausmaß der induzierten CD86-Expression nicht mit dem der T-Zell-Aktivierung korrelierte. Es ist bekannt, dass eine gewisse Dichte an antigenen Peptiden auf der Oberfläche der DCs notwendig ist, um die Bildung einer effektiven immunologischen Synapse sicherzustellen (Huppa und Davis, 2003). Nach erfolgter Bildung der immunologischen Synapse werden schließlich Adhäsion- und kostimulatorische Moleküle durch eine Art Signalkopplung weiter hochreguliert, um die Stabilität dieser Synapse zu erhöhen und die Reaktion aufrecht zu erhalten. Geschieht dies in unterschiedlicher Stärke und zu unterschiedlichen Zeitpunkten, lässt sich das Ausmaß der DC-Aktivierung nicht 1:1 auf das der T-Zell-Aktivierung übertragen. Die Beobachtung, dass sich die T-Zell-Aktivierung (mit Ausnahme von einem Donor) nicht in einer induzierten CD25-Expression widerspiegelt, verdeutlicht abermals die Schwierigkeit einen optimalen Analysezeitpunkt für verschiedene Aktivierungsparameter zu definieren. Neben den Reaktionen, in denen kostimulatorische Signale durch die moDCs bereitgestellt wurden, konnten auch induzierte T-Zell-Proliferationen detektiert werden ohne dass solch kostimulatorische Moleküle zuvor auf den moDCs exprimiert wurden. Dies war sowohl beim aggregierten als auch beim nativen Remicade bei je zwei Donoren der Fall (Donor # 2 und # 7). Den Grund hierfür gilt es noch zu untersuchen.

Zusammengefasst zeigen die experimentellen Daten, dass der Grad der Anfälligkeit zur Aggregation zwischen verschiedenen mAk stark variieren kann. Dies ist vermutlich auf unterschiedliche intrinsische Eigenschaften, wie beispielsweise die Primärstruktur, zurückzuführen. Ein Vergleich der *in vitro* detektierten Reaktionen mit dem klinischen Potenzial der einzelnen mAk zur Induktion einer ADA-Produktion im Patienten verdeutlicht die Grenzen eines *in vitro* Systems. Für MabThera (Rituximab) und Arzerra (Ofatumumab) wurden in Anlehnung an die klinische Situation keine oder lediglich geringe Reaktionen erwartet (Baker *et al.*, 2010; Piro *et al.*, 1999). Dies stimmt mit den *in vitro* detektierten Reaktionen überein. Das klinische Potenzial von Adalimumab (Humira) zur Induktion von ADAs konnte weder in nativer noch in aggregierter Form im untersuchten *in vitro* System an immunkompetenten Zellen gesunder Donoren abgebildet werden. Ausschlaggebend hierfür waren fehlende *Danger*-Signale. Insbesondere bei Patienten mit entzündlichen Erkrankungen, die eine Adalimumab-Therapie erhalten, sind diese Signale in Form erhöhter TNF- α -Level vermehrt vorhanden. Am Beispiel von Remicade hingegen konnte gezeigt werden, dass aggregierte mAk im Gegensatz

zu ihrer nativen Form auch *in vitro* in der Lage sein können, die Expression kostimulatorischer Moleküle auf DCs sowie eine anschließende primäre T-Zell-Aktivierung zu induzieren. Da Infliximab (Remicade) bereits nach erster Infusion in bis zu 45 % der Patienten ADAs induziert (Baert *et al.*, 2003), verfügt dieser mAk unter den hier getesteten therapeutischen Antikörpern diesbezüglich über die höchste Immunogenität. Somit ist es möglich, dass diese Immunogenität im Rahmen des *in vitro* Kokultursystems, aufgrund fehlender *Danger*-Signale im Vergleich zur *in vivo* Situation, erst durch eine Aggregation von Remicade hervorgebracht wurde.

4.1.5 Maximale Immunreaktionen *in vitro* mittels allogenen Stimulus

Die MLR wurde eingesetzt, um maximale T-Zell-Reaktionen zu induzieren und somit die Grenzen eines *in vitro* Kokultursystems zu untersuchen. Das fremde HLA auf der Oberfläche der allogenen PBMCs diente hier als aktivierender Stimulus. Die für die Experimente der MLR etablierte effektive MitC-Konzentration zur Inhibierung der Stimulator-Zellpopulation lag mit 75 µg/ml deutlich über der eingesetzten Konzentration veröffentlichter Studien (25 µg/ml; Bach und Voynow, 1966; Hirsch *et al.*, 1972).

Für eine Induktion maximaler T-Zell-Reaktionen wurde der Einfluss unterschiedlicher Stimulator-Zellzahlen und verschiedener Plattentypen auf diese Reaktionen untersucht.

Beim analysierten Endpunkt der T-Zell-Proliferation ließen sich nach sechstägiger Kokultivierung mit allogenen PBMCs ab einem Zellzahlverhältnis von 1:2 (T-Zellen: allogene PBMCs; R:S) zunächst keine Unterschiede zwischen den Ansätzen in Abhängigkeit vom gewählten Plattentyp erkennen. Folglich war die induzierte Proliferation der T-Lymphozyten in diesen Kokulturen mit um die 60 % vermutlich bereits maximal, sodass sich keine Unterschiede mehr herausfiltern ließen. Dies wird dadurch untermauert, dass sich ein Zellzahlverhältnis von 1:1 als suboptimal für die Induktion einer T-Zell-Proliferation erwies und Unterschiede zwischen den Plattentypen zugunsten der Rundbodenplatten (35,4 % höhere Proliferation) hervorbrachte. Erst die Berechnung des SI verdeutlichte schließlich den Einfluss der unterschiedlichen Plattentypen auf die induzierten T-Zell-Proliferationen. Der SI bezieht die Hintergrundproliferation der T-Lymphozyten in Monokultur mit ein, indem dieser Index aus dem Quotienten proliferierender T-Zellen der Kokultur und deren jeweiligen Kontrollansätzen (Monokulturen der T-Lymphozyten in korrespondierender Zellzahl) gebildet wird (Bromelow *et al.*, 2001). So waren die absoluten T-Zell-Proliferationen in den Kokulturen auf den unterschiedlichen Platten zwar miteinander vergleichbar, die Hintergrundproliferationen der T-Zellen in den Monokulturen unterschieden sich jedoch. So ergab ein Vergleich der SI eine begünstigte Stimulation der *Responder*-T-Lymphozyten auf Flachbodenplatten. Eine Analyse der CD25-Expression von T-Lymphozyten an Tag 6 der Kokultur zeigte darüber hinaus, dass keine exakte Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil CD25-positiver und proliferierender

Zellen besteht (Caruso *et al.*, 1997). Im Gegensatz zur Proliferation erzielte ein Zellzahlverhältnis von 1:2 (R:S) eine maximale CD25-Expression.

Diese Ergebnisse belegen, dass es möglich ist primäre T-Zell-Reaktionen auf xenogene Proteine in einem *in vitro* Kokultursystem zu induzieren.

In einer erweiterten MLR wurde anschließend durch eine Restimulation der Zellen mit dem antigenen Stimulus die Möglichkeit zur Induktion einer sekundären Immunreaktion untersucht. Ansätze einer klassischen MLR über eine Kultivierungsdauer von sechs und 12 Tagen ohne Restimulation dienten als Kontrolle. Im Fokus stand der Vergleich der induzierten Reaktionen an Tag 6 der Kokultur (primäre T-Zell-Reaktionen) mit denen an Tag 12 nach erfolgter Restimulation (sekundäre T-Zell-Reaktionen). Nach stattgefundenem *Priming* sind T-Zellen bei wiederholtem Kontakt mit demselben Antigen in der Lage, im Rahmen einer sekundären Immunreaktion schneller und effektiver zu reagieren. Demzufolge war eine Verstärkung der induzierten Reaktionen nach wiederholtem Kontakt mit dem antigenen Stimulus zu erwarten. Um sicherzustellen, dass eine mögliche Verstärkung induzierter Reaktionen im Vergleich zu Tag 6 nicht in der verlängerten Kultivierungsdauer von 12 Tagen begründet liegt, wurde für diesen Zeitraum ein zusätzlicher Ansatz ohne erfolgte Restimulation analysiert. Die Ergebnisse dieser erweiterten MLR bestätigen die Annahme, dass durch eine verlängerte Kultivierungsdauer ein höherer prozentualer Anteil proliferierender Zellen detektiert wird (1,66-fach höher als an Tag 6). Die CD25-Expression hingegen nahm mit zunehmender Kultivierungsdauer um das 3,35-fache ab. Ursächlich hierfür ist die Tatsache, dass es sich bei CD25, der α -Kette des IL-2-R, um einen nicht konstitutiv exprimierten Aktivierungsmarker handelt. Der IL-2-R besteht aus drei Untereinheiten (α -, β - und γ -Kette), von denen ausschließlich die γ -Kette (CD132) konstitutiv exprimiert wird, während die übrigen beiden induzierbar sind (Minami *et al.*, 1993). Es ist wahrscheinlich, dass die CD25-Expression an Tag 0 der Kokultur durch den starken allogenen Stimulus induziert wurde, die Expression beim Ausbleiben weiterer Aktivierungssignale mit zunehmender Kultivierungsdauer jedoch wieder abnahm. Monokulturen der T-Lymphozyten wiesen mit zunehmender Kultivierungsdauer eine minimal erhöhte CD25-Expression auf, die durch die Kultivierung an sich hervorgerufen worden sein könnte. Aufgrund des fehlenden allogenen Stimulus blieb eine starke Aktivierung und Induktion der CD25-Expression jedoch aus. Nach Restimulation der T-Lymphozyten mit weiteren allogenen PBMCs an Tag 6 lag die T-Zell-Proliferation an Tag 12 zwar deutlich über der von Tag 6 (1,69-fache Induktion), unterschied sich jedoch kaum von der an Tag 12 ohne Restimulation (1,7 % \uparrow). Da der prozentuale Anteil proliferierender T-Zellen mit 81,9 % an Tag 12 bereits hoch war und die einzelnen Wells der Zellkulturplatten dadurch auch ohne Restimulation eine hohe Zelldichte aufwiesen, könnten diese Kulturbedingungen für die ausbleibende Steigerung der Zellproliferation nach Restimulation verantwortlich gewesen sein.

Dieses Phänomen ist als Kontaktinhibition (*contact inhibition*; CI) bekannt: Bei hoher Zelldichte stoppen Zellen ihre Proliferation und gehen in einen Zellzyklusarrest über (Leontieva *et al.*, 2014). Die CD25-Expression hingegen lag an Tag 12 nach Restimulation deutlich unter der an Tag 6 vor Restimulation (2,39-fach ↓). Vermutlich reichte hier eine Zeitspanne von sechs Tagen zwischen den einzelnen allogenen Stimulationen (Tag 0: *Priming*; Tag 6: Restimulation) nicht aus, um diese Expression erneut zu induzieren.

Mit einer MLR ist es somit möglich, primäre T-Zell-Reaktionen auf xenogene Proteine in einem *in vitro* Kokultursystem zu induzieren und zu detektieren. Die Wahl geeigneter Zellkonzentrationen ist ein entscheidender Faktor, um maximale, nicht weiter induzierbare Reaktionen zu Beginn der Kultur zu vermeiden und eine Analyse sekundärer Reaktionen zu gewährleisten. Es ist zu vermuten, dass weniger potente Antigene keine vergleichbar starke Proliferation initiieren, wie es bei den xenogenen HLA-Molekülen der Fall war. Folglich wäre das Problem einer möglichen Kontaktinhibition weniger relevant.

4.2 *In vitro* Assay zur Vorhersage systemischer Zytokinfreisetzungen

Therapeutische mAk haben nicht nur das Potenzial im Menschen unerwünschte klassische Immunreaktionen in Form einer ADA-Produktion auszulösen, sondern sind auch in der Lage nach erster Verabreichung beim Patienten starke systemische Zytokinfreisetzungen zu induzieren. Diese seltene, aber schwerwiegende Nebenwirkung von mAk wird als *Cytokine Release Syndrom* (CRS) bezeichnet und wurde bereits von Gruppen wie der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*; WHO) und dem *National Cancer Institute* (NCI) als unerwünschtes Ereignis auf Basis ihres Schweregrades klassifiziert (Skala 1 – 5; *Common Terminology Criteria for Adverse Events*, 2017). Die Identifikation und Vorhersage solch adverser systemischer Zytokinfreisetzungen ist somit ein entscheidender Faktor in der präklinischen und klinischen Sicherheitsbewertung therapeutischer Antikörper und bedarf geeigneter *in vitro* Tests.

In der vorliegenden Arbeit wurden die durch mAk induzierten Reaktionen im Rahmen der Vollblut- sowie der PBMC-Methode untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Ziel war es, das bekannte klinische Potenzial der getesteten mAk zur Auslösung systemischer Zytokinfreisetzungen *in vitro* abzubilden.

Vor einem Vergleich beider Methoden galt es geeignete Kulturbedingungen zu etablieren. Hierzu zählten die optimale Stimulationsdauer der Zellen mit den mAk, die Wahl des Mikrotiterplattentypen und die Art der Analyse der induzierten Zytokinsekretionen.

Eine Zytokinanalyse nach 24-stündiger Stimulation der Zellen mit den jeweiligen mAk erwies sich als optimal. Hier zeigte sich beim überwiegenden Anteil der Zytokine eine maximale oder eine mit einer 48-stündigen Stimulation vergleichbare Sekretion. Die einzige Ausnahme bildete das früh sezernierte Zytokin IL-2 (Deng und Mosmann, 2015). Obwohl dieses Zytokin bereits nach einer sechsstündigen Stimulation der Zellen mit dem TGN1412-Analogen ANC28.1 eine maximale Konzentration aufzeigte, konnten auch nach 24 Stunden noch ausreichende Mengen IL-2 detektiert werden. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen der Studien von Wolf und Kollegen nach Stimulation der Zellen des Vollblutes mit TGN1412L (*TGN1412-like material*) (Wolf *et al.*, 2012). Auch sie untersuchten Stimulationsdauern von sechs, 24 und 48 Stunden und detektierten eine maximale IL-2-Sekretion bereits nach sechsstündiger Stimulation. Die übrigen analysierten Zytokine erreichten ihre Peak- oder Plateau-Konzentrationen nach einer Stimulation von 24 Stunden. So wurde für TGN1412L eine Stimulationsdauer von 24 Stunden etabliert. Darüber hinaus analysierten Wolf *et al.* den anti-CD28 mAk ANC28.1. Die durch eine Stimulation mit ANC28.1 entstandene Kinetik der Zytokinsekretion, mit maximalen Sekretionen nach 48 Stunden, stimmt jedoch nicht mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit für ANC28.1 überein. Die Tatsache, dass diese Ergebnisse der Studien von Wolf *et al.* lediglich auf den Untersuchungen eines Donors basieren und sich ANC28.1 in fortführenden Experimenten von

Wolf und Kollegen an 20 Donoren als potenterer Stimulator im Vergleich zu TGN1412L herausstellte, relativiert diese Beobachtung jedoch (Wolf *et al.*, 2012). Trotz divergierender Inkubationszeiten einiger weniger veröffentlichter Studien zur Etablierung eines CRAs (Walker *et al.*, 2010; Wing *et al.*, 1995), wurde in den meisten Studien ebenfalls eine Stimulationsdauer von 24 Stunden angewandt (Finco *et al.*, 2014). Es ist festzuhalten, dass sich die Inkubationszeiten *in vitro* deutlich von dem rapiden Auftreten des Zytokinsturms *in vivo* unterscheiden. *In vivo* wurden maximal erhöhte Zytokinkonzentrationen bereits innerhalb der ersten zwei bis vier Stunden nach erster Infusion im Serum detektiert (Suntharalingam *et al.*, 2006).

Ein weiterer Aspekt bei der Etablierung geeigneter Kulturbedingungen war die Wahl des Mikrotiterplattentypen. Das Material der Platten spielt insbesondere bei ihrer Beschichtung mit den mAk im Rahmen der PBMC-Methode eine wichtige Rolle. Findlay und Kollegen beschichteten sowohl PP- als auch PS-Platten mit TGN1412 (*wet-coat* und *dry-coat*) und verglichen ihren Einfluss auf die induzierten Zytokinsekretionen von PBMCs (Findlay *et al.*, 2010). Die niedrigsten Zytokinkonzentrationen als Reaktion der Zellen auf immobilisiertes TGN1412 erzielte eine Beschichtung von PS-Platten via *wet-coating*. Weiterführende Experimente dieser Studie zeigten, dass dieses Ergebnis zum einen auf eine geringere Bindung des mAk an PS-Platten während der Beschichtung und zum anderen auf seine Orientierung nach der Immobilisation zurückzuführen war. Letzteres machte die CD28-spezifische, variable Region von TGN1412 schwerer für CD28 zugänglich, was wiederum die Aktivierung der CD28-exprimierenden Zielzellen und somit die durch TGN1412 induzierten Zytokinfreisetzen reduzierte (Findlay *et al.*, 2010). Auch in den Experimenten der vorliegenden Arbeit (PBMC-Methode, *wet-coating*) resultierte die Verwendung von PP-Platten bei den mAk MabThera und Erbitux in einer höheren Zytokinfreisetzung im Vergleich zur induzierten Zytokinsekretion auf PS-Platten. Die Ursache hierfür wurde im Rahmen dieser Dissertation nicht untersucht. Ein entscheidender Unterschied zu den Studien von Findlay und Kollegen besteht jedoch in den durch die Negativkontrolle induzierten Reaktionen. Während in den Studien von Findlay *et al.* der Kontrollantikörper Tysabri (Natalizumab) nur minimale Reaktionen auf PP-Platten auslöste, induzierte der Kontrollantikörper Erbitux in den Experimenten der vorliegenden Arbeit auf PP-Platten eine klare Sekretion der dargestellten Zytokine. Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurden für die nachfolgenden Experimente PS-Mikrotiterplatten verwendet. In diesem Kontext ist zu erwähnen, dass auch nach Veröffentlichung der Ergebnisse von Findlay *et al.* (2010) in darauf folgenden Studien PS-Platten im Rahmen des CRA verwendet wurden (Bailey *et al.*, 2013; Wolf *et al.*, 2012).

Von hoher Bedeutung war abschließend die Art der Analyse induzierter Zytokinsekretionen. Auch hier weisen veröffentlichte Studien verschiedene Vorgehensweisen auf. In der

vorliegenden Arbeit wurde für die Bestimmung der Frequenz positiver Reaktionen eine Schwellenwert-Analyse angewandt. Hierbei wurden die durch die verschiedenen mAk induzierten Zytokinkonzentrationen mit einem Schwellenwert verglichen, der auf den Zytokinsekretionen aller Donoren nach Stimulation mit einem klinisch unauffälligen mAk basierte. Reaktionen mit Zytokinkonzentrationen oberhalb dieses Schwellenwertes wurden als positiv erachtet. Ein mAk, welches bereits in anderen Studien zum CRA keine Reaktionen induzierte (Walker *et al.*, 2011) oder sogar als Negativkontrolle verwendet wurde (Bailey *et al.*, 2013), ist Erbitux. Erbitux ist ein Inhibitor des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (*epidermal growth factor receptor*; EGFR), der zur Behandlung von metastasierenden Karzinomen eingesetzt wird (Lièvre *et al.*, 2006). Sein klinisches Nebenwirkungsprofil ist nicht mit einem CRS assoziiert, lediglich das Auftreten von Hypersensitivitätsreaktionen in einer sehr kleinen Minderheit von Patienten ist bekannt (Chung *et al.*, 2008; George *et al.*, 2010). Auch die Firma *ProImmune* etablierte bereits einen CRA, in dem der mAk Erbitux zur Generierung eines Schwellenwertes genutzt wird (*ProImmune*, ProStorm™, 2018). Auf vergleichbare Weise, jedoch mit einem anderen klinisch unauffälligen mAk (Tysabri, Natalizumab), wurde in den Studien von Wolf *et al.* die Anzahl reagierender Donoren für jedes analysierte Zytokin bestimmt (Wolf *et al.*, 2012). In der vorliegenden Arbeit ergab die Schwellenwert-Analyse mit Erbitux eine Frequenz positiver Reaktionen auf den mAk Remicade von 37,5 % bei maximaler Konzentration (100 µg/ml). Bei ANC28.1 stieg die Frequenz positiv reagierender Donoren konzentrationsabhängig auf bis zu 100 %. Bei einem Vergleich dieser Resultate mit den klinischen Inzidenzen wird schnell deutlich, dass bei alleiniger Betrachtung der Frequenzen positiv reagierender Donoren das tatsächliche Ausmaß der Reaktionen schnell überschätzt werden kann. ANC28.1 (Klon ANC28.1/5D10) wird heutzutage in der immunologischen Forschung oftmals als Analogon des mAks TGN1412 (TeGenero; kommerziell nicht mehr erhältlich) eingesetzt (Finco *et al.*, 2014; Walker *et al.*, 2011; Wolf *et al.*, 2012), der in der Klinik mit einem schweren CRS assoziiert ist (Grimaldi *et al.*, 2016; Stebbings *et al.*, 2007; Suntharalingam *et al.*, 2006). Dies spiegelt sich auch darin wider, dass die Reaktionen aller getesteter Donoren über dem Schwellenwert lagen. Diese Frequenzen positiver Reaktionen nach ANC28.1-Stimulation sind folglich mit den klinischen Inzidenzen von TGN1412 vergleichbar. Anders verhält es sich beim mAk Remicade, der klinisch nicht mit einem CRS assoziiert ist (Bugelski *et al.*, 2009; Dhir *et al.*, 2012) und dennoch im Rahmen des *in vitro* Testsystems bei 37,5 % der Donoren Reaktionen oberhalb des Schwellenwertes auslöste. Erst bei Betrachtung der Skalierung, d.h. der dazugehörigen absoluten Zytokinkonzentrationen, wird das tatsächliche Ausmaß der Reaktionen deutlich. Die IL-10-Konzentration lag nach Stimulation mit Remicade bei den positiv reagierenden Donoren nur knapp über dem generierten Schwellenwert (< 0,25 pg/ml), während ANC28.1 beim überwiegenden Anteil reagierender Donoren eine ungefähr 100- bis 1000-fach höhere IL-10-Sekretion induzierte (max.

232,66 pg/ml). Dieses Beispiel veranschaulicht die Problematik einer alleinigen Betrachtung der Frequenz positiver Reaktionen. Infolgedessen wurde eine Datenanalyse etabliert, bei der die ermittelten Frequenzen positiv reagierender Donoren, d.h. Reaktionen oberhalb des mit Erbitux generierten Schwellenwertes, gegen die medianen Zytokinkonzentrationen aller Donoren aufgetragen wurden. Die Daten werden durch diese Analyse komprimiert, sodass der prozentuale Anteil positiver Reaktionen und die sezernierten Zytokinkonzentrationen aller Donoren zu einem Datenpunkt zusammengefasst werden. Dadurch ist pro analysierten Zytokin lediglich ein Graph nötig, der die Ergebnisse aller analysierten mAk zusammenfasst. Aufgrund der übersichtlichen Darstellung und der dadurch vereinfachten Interpretation der großen Datenmenge, welche durch die Multiplex-Zytokinanalyse generiert wurde, ermöglichte diese Analyse die Gegenüberstellung der durch unterschiedliche mAk induzierten Reaktionen innerhalb der Vollblut- und der PBMC-Methode.

In Übereinstimmung mit den sowohl *in vivo* als auch *in vitro* detektierten Zytokinen im Rahmen eines CRS standen insbesondere die proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-6 und IL-2 und die antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 im Fokus der Analyse (Suntharalingam *et al.*, 2006; Finco *et al.*, 2014).

4.2.1 Reaktionen therapeutischer Antikörper im *Cytokine Release Assay*

Im Rahmen der Vollblut-Methode zeigte die Positivkontrolle die erwartete Induktion aller Zytokine bei 100 % der Donoren (detaillierte Einzeldaten in Kap. 3.3.2).

Unter Verwendung der PBMC-Methode waren nach Stimulation der Zellen mit der Positivkontrolle bei TNF- α und IL-6 sowohl die sezernierten Konzentrationen als auch die prozentualen Anteile der *Responder* mit denen des Vollblut-CRAs vergleichbar. IL-10 und IL-4 hingegen wiesen bei einem Anteil von 100 % an *Respondern* deutlich niedrigere Konzentrationen innerhalb des PBMC-CRAs auf. IFN- γ zeigte im PBMC-CRA nicht nur eine geringere Frequenz an *Respondern*, sondern lag auch in den Konzentrationen deutlich niedriger. Der Grund hierfür bleibt zu klären. Da IFN- γ überwiegend von T- und NK-Zellen produziert wird und beide Zelltypen innerhalb der PBMC Population vorhanden sind, hätte eine vergleichbare bzw. höhere Sekretion erwartet werden können. Anders verhielt es sich bei IL-2. Hier lag die Frequenz an *Respondern* bei nur 60 %, dennoch war die Konzentration mit der im Rahmen der Vollblut-Methode weitestgehend vergleichbar. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bereits der mit Erbitux generierte Schwellenwert für IL-2 innerhalb des PBMC-CRAs höher lag, was zu einer niedrigeren Frequenz positiv reagierender Donoren führte. Es hätte jedoch erwartet werden können, dass der prozentual höhere Anteil an T-Lymphozyten in PBMCs im Vergleich zum Vollblut zu einer deutlich höheren kumulativen Sekretion der T-Zell-Zytokine wie IL-4 und insbesondere IL-2 als Reaktion auf PHA führt (Movafagh *et al.*, 2011). Eine mögliche

Ursache für die geringen Konzentrationen könnte in der Methodik selber liegen. Während die Positivkontrolle beim Vollblut-CRA in löslicher Form zur Kultur gegeben wurde, erfolgte die Stimulation der PBMCs via *wet-coating*. Hierbei wurden die Wells über Nacht mit der Testsubstanz inkubiert und vor Kultivierung der PBMCs mit PBS gewaschen. Möglicherweise war die Beschichtung der Wellböden mit diesen Proteinen im Vergleich zu einer Beschichtung mit mAk weniger stabil, wodurch weniger Substanz für eine mögliche Stimulation zur Verfügung stand, was wiederum zu geringeren Zytokinsekretionen geführt haben könnte. In diesem Kontext ist zu erwähnen, dass Finco *et al.* in ihrer Publikation zeigten, dass die Firma Genentech mit einer Stimulation der PBMCs mit PHA bei gleicher Methodik deutlich höhere IL-4- (< 5 – 22 pg/ml) und IL-2-Konzentrationen (33 – 614 pg/ml) erzielten (Finco *et al.*, 2014). Während diese Zytokin-Konzentrationen aus einer Stimulation mit 100 µg/ml PHA resultierten, wurde in der vorliegenden Arbeit beim kombinierten Stimulus mit LPS eine PHA-Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt. Hinsichtlich dieser Ergebnisse könnte es sein, dass bei Verwendung höherer PHA-Konzentrationen mehr gebundene Proteine für eine darauf folgende Zellaktivierung zur Verfügung stehen, die letztendlich mit der Aktivierung innerhalb der Vollblut-Methode vergleichbar wäre.

Bei Remicade (Infliximab) zeigten sich zum Teil positive Reaktionen, die lediglich auf extrem niedrige Schwellenwerte zurückzuführen waren. Die induzierten absoluten Zytokinlevel waren so niedrig, dass sie als nicht relevant eingestuft wurden. Diese werden deshalb an dieser Stelle als nicht induziert behandelt.

Somit induzierte Remicade sowohl im Vollblut- als auch im PBMC-CRA keine immuntoxikologisch relevanten Reaktionen der getesteten Donoren. Im Rahmen beider Methoden nahm vor allem TNF- α eine besondere Stellung ein.

Beim Vollblut-CRA zeigte TNF- α als einziges der gemessenen Zytokine über die gesamte Remicade-Konzentrationsspanne hinweg keine Reaktionen oberhalb des Schwellenwertes. Folglich lag der Anteil an *Respondern* hier bei 0 %. Dieses Ergebnis kann auf den Wirkmechanismus von Remicade zurückgeführt werden. Bei Remicade handelt es sich um einen potenten antiinflammatorischen mAk, der gegen TNF- α gerichtet ist und in der Therapie von chronisch inflammatorischen Erkrankungen wie beispielsweise bei rheumatoider Arthritis oder Morbus Crohn zum Einsatz kommt (Anderson, 2005). Er bindet TNF- α mit hoher Affinität, Avidität und Spezifität und neutralisiert so seine biologische Aktivität (Figueiredo *et al.*, 2008). Infolgedessen steht gebundenes TNF- α für eine Detektion im Serum mittels Elektrochemilumineszenz nicht mehr zur Verfügung.

Auch beim PBMC-CRA spiegelten die TNF- α -Konzentrationen nach Stimulation mit Remicade den Wirkmechanismus dieses therapeutischen anti-TNF- α Antikörpers wider. Remicade induzierte über die gesamte Konzentrationsspanne hinweg die niedrigsten TNF- α -

Konzentrationen im Vergleich zu den anderen mAk, wenngleich diese Konzentrationen bei 0,1 und 1 µg/ml oberhalb des korrespondierenden Schwellenwertes lagen.

Entsprechend dieser Ergebnisse siedeln sich die Remicade-induzierten Reaktionen bei beiden CRAs deutlich im unteren Bereich der nach Stimulation mit verschiedenen mAk detektierten Zytokinfreisetzung an. Dies stimmt mit dem klinischen Nebenwirkungsprofil von Remicade überein, bei dem keine Assoziation mit einem CRS bekannt ist (Bugelski *et al.*, 2009; Figueiredo *et al.*, 2008; Grimaldi *et al.*, 2016). Folglich hat die Wahl der angewandten Methode erwartungsgemäß keine Auswirkungen auf die Einstufung der Wirkungsstärke von Remicade. Aufgrund seines Wirkungsprofils wurde Remicade in anderen Studien zum CRA als Negativkontrolle eingesetzt (Dhir *et al.*, 2012).

MabThera induzierte *in vitro* sowohl im Vollblut- als auch im PBMC-CRA Zytokinsekretionen, die in ihren Konzentrationen im Gesamtbild im unteren bis mittleren Bereich der durch die mAk induzierten Reaktionen lagen.

Bei MabThera (Rituximab) handelt es sich um einen therapeutischen mAk gegen das transmembrane Oberflächenantigen CD20, welches von B-Lymphozyten exprimiert wird. Durch seine Bindung an CD20+ B-Zellen induziert MabThera eine selektive Zelldepletion, welche durch multiple Mechanismen ausgelöst werden kann. Zu diesen Mechanismen zählt zum einen die direkte Induktion der Apoptose, indem die Bindung von Rituximab die Calciumkanal-Funktion von CD20 stört und zu einem erhöhten intrazellulären Calcium-Level in CD20⁺ Zellen führt (Shan *et al.*, 1998). Zum anderen können auch komplementabhängige B-Zell-Lyse (*complement-dependent cytotoxicity*; CDC) sowie antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*; ADCC) zur selektiven B-Zell-Depletion führen (Cerny *et al.*, 2002; Weiner, 2010). Folglich kommt MabThera insbesondere bei lymphoproliferativen Erkrankungen wie beispielsweise den Non-Hodgkin-Lymphomen zum Einsatz (Piro *et al.*, 1999). Obwohl das Risiko ernster Nebenwirkungen nach Rituximab-Administration sehr gering ist, löste eine erste Verabreichung dennoch in der Vergangenheit in etwa 10 % der Fälle ein schweres CRS aus (Barnett *et al.*, 2013; Chung, 2008). Die einzelnen Fallberichte hierzu sind in Publikationen zusammengefasst worden (Kulkarni und Kasi, 2012; Makino *et al.*, 2013). Üblicherweise sind die ausgelösten Nebenwirkungen nach erster Rituximab-Administration bei der Mehrheit der Patienten (ungefähr 77 %) jedoch von schwacher bis moderater Toxizität (CTCAE-Schweregrad: 1-2) (Chung, 2008; Grimaldi *et al.*, 2016; Kulkarni und Kasi, 2012; Vessillier *et al.*, 2015; Winkler *et al.*, 1999). Es wird angenommen, dass die Nebenwirkung einer systemischen Zytokinfreisetzung innerhalb der ersten zwei Stunden nach Infusion mit einer Kreuzvernetzung (*Cross-linking*) von CD20⁺ B-Zellen durch Rituximab, anschließender Komplementaktivierung und der Lyse der Targetzellen in Verbindung steht (Kulkarni und Kasi, 2012; Makino *et al.*, 2013; Seifert *et al.*, 2006). Des

Weiteren trägt die Interaktion der Fc-Domäne von Rituximab mit Fc γ -Rezeptoren auf beispielsweise Makrophagen und vor allem NK-Zellen zur zusätzlichen Zytokinfreisetzung durch diese Nicht-Effektorzellen bei (Maggi *et al.*, 2011; van der Kolk *et al.*, 2001). So generiert ein intensives *Cross-linking* von CD20 durch Rituximab und FcR-exprimierenden Zellen in Folge stärkere und/oder länger anhaltende Signale als eine einfache CD20-Ligation.

Innerhalb des im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Vollblut-CRAs lagen die Frequenzen an *Respondern* und die induzierten Zytokinkonzentrationen nach MabThera-Stimulation über denen nach Stimulation mit Remicade. Auch wenn die sezernierten IFN- γ -Konzentrationen in etwa denen nach OKT3-Stimulation (0,1-100 $\mu\text{g/ml}$) entsprachen und auch die TNF- α -, IL-10- und IL-6-Konzentrationen mit denen von OKT3 im Konzentrationsbereich von 0,1 – 10 $\mu\text{g/ml}$ vergleichbar waren, wurden im Gesamtbild vergleichsweise niedrige Zytokinkonzentrationen gemessen. Vergleichbare Reaktionen wurden in bereits veröffentlichten *in vitro* CRA-Studien mit Rituximab detektiert. Die CRA-Arbeitsgruppe des Immuntoxikologie-Ausschusses des ILSI-HESI (*International Life Sciences Institute - Health and Environmental Sciences Institute*) führte 2014 eine Umfrage zur angewandten Methodik für die Detektion eines CRS durch, an der sowohl Firmen der pharmazeutischen Industrie als auch einige CROs (*contract research organizations*) teilnahmen (Finco *et al.*, 2014). Die veröffentlichten Daten enthielten unter anderem Ergebnisse eines Vollblut-CRAs, der methodisch dem Vollblut-CRA der vorliegenden Arbeit entsprach (Inkubationszeit mit löslichem mAk: 24 h; Donoren: 6; Zytokinmessung: MSD). Die durch Rituximab (100 $\mu\text{g/ml}$) induzierten Zytokinkonzentrationen lagen auch hier über den Werten der Negativkontrolle (PBS). Die Reaktionen waren jedoch im Vergleich zu potenteren mAk, wie Orthoclone oder ANC28.1, ebenfalls um ein Vielfaches geringer. Obwohl die Einstufung der Rituximab-induzierten Reaktionen im Gesamtbild der Potenz verschiedener mAk vergleichbar war, lagen die detektierten medianen Konzentrationen der Zytokine IL-4, IL-2, TNF- α , IL-6 und IL-10 in der vorliegenden Arbeit unter denen der veröffentlichten Studie. Lediglich die mediane IFN- γ -Konzentration nach Stimulation mit 100 $\mu\text{g/ml}$ MabThera (21,39 pg/ml) war mit der Konzentration der veröffentlichten Daten vergleichbar (Finco *et al.*, 2014).

Im PBMC-CRA wurden für die Zytokine TNF- α , IL-6, IL-10 und IL-2 höhere maximale, mediane Konzentrationen im Vergleich zum Vollblut-CRA detektiert, wobei insbesondere die TNF- α -Sekretion durch PBMCs die der Zellen im Vollblut deutlich überschritt (20-fache Induktion). IL-6, IL-10 und IL-2 zeigten geringere Induktionen um das 2,5 – 4-fache. Lediglich die IFN- γ -Konzentration nach MabThera-Stimulation lag ein 5-faches unter der Konzentration innerhalb der Vollblut-Methode. Auf IL-4 hatte die Wahl der Methode keinen Einfluss. Die maximalen Frequenzen positiver Reaktionen waren bei beiden Methoden vergleichbar. Unter Berücksichtigung des Wirkmechanismus von Rituximab hätte erwartet werden können, dass eine Immobilisierung von MabThera durch die Beschichtung der Wellböden mit diesem mAk,

wie es im Rahmen des PBMC-CRAs stattfand, den *in vivo* Mechanismus der Kreuzvernetzung simuliert und die Target-B-Lymphozyten zu einer gesteigerten Zytokinsekretion aktiviert (Bugelski *et al.*, 2009). Allerdings ist im Fall von Rituximab zu bedenken, dass durch die Immobilisierung an den Wellboden seine Fc-Region nicht mehr für eine Interaktion mit FcR-exprimierenden Zellen wie NK-Zellen zur Verfügung steht. Infolgedessen kann keine zusätzliche Aktivierung und Zytokinfreisetzung durch Nicht-Effektorzellen stattfinden. Dies könnte die geringere IFN- γ -Sekretion in der PBMC-Methode verglichen mit der Vollblut-Methode erklären, da IFN- γ neben B-Lymphozyten auch von aktivierten NK-Zellen in hohen Konzentrationen produziert wird (Lund, 2008; Perussia, 1996). Die im PBMC-CRA induzierten Zytokinsekretionen können somit das Resultat einer gesteigerten Aktivierung der Targetzellen und einer verminderten Aktivierung von Nicht-Effektorzellen durch inhibierte Fc-FcR-Interaktionen im Vergleich zur Vollblut-Methode sein. Je nach Grad des Einflusses der jeweiligen Aktivierungen auf die Sekretionen der einzelnen Zytokine (fehlende Kreuzvernetzung der Targetzellen im Vollblut-CRA vs. fehlende Aktivierung von FcR-exprimierenden Zellen im PBMC-CRA), könnten so die unterschiedlichen Zytokinprofile entstanden sein. Im Fall von TNF- α würde dies beispielsweise bedeuten, dass eine gesteigerte B-Lymphozyten-Aktivierung aufgrund der Kreuzvernetzung mehr Einfluss auf die TNF- α -Sekretion hat als eine zusätzliche Aktivierung von FcR-exprimierenden Zellen. Auf gleiche Weise könnten auch die geringen Erhöhungen einzelner Zytokinkonzentrationen begründet werden.

Unabhängig von der angewandten Methodik wurde bei keinem der getesteten Donoren eine starke Zytokinfreisetzung durch eine Rituximab-Stimulation induziert, die auf das Potenzial dieses mAk zur Induktion eines schweren CRS hinweisen würde. Zum einen könnte dies darauf zurückzuführen sein, dass die hier getestete Anzahl von acht bzw. fünf Donoren zu gering ist, um solch seltene Reaktionen auf Rituximab *in vitro* abzubilden (Walker *et al.*, 2011). Zum anderen ist bekannt, dass die klinischen Symptome während einer Rituximab-Therapie mit dem Grad der Zytokinfreisetzung und diese wiederum mit der Tumorlast des Patienten, d.h. mit der Anzahl zirkulierender Tumorzellen (B-Lymphozyten) vor der ersten Infusion korreliert (Maloney *et al.*, 1997; McLaughlin *et al.*, 1998; Winkler *et al.*, 1999). So zeigte sich in einer klinischen Studie an Patienten mit Chronischer Lymphatischer Leukämie (CLL), dass Patienten mit mehr als 50×10^9 Lymphozyten/l ein schwereres CRS erlitten (CTCAE-Schweregrad: 3 – 4) als Patienten mit weniger Lymphozyten (Winkler *et al.*, 1999). Das CRS nach Rituximab-Behandlung äußerte sich in diesen klinischen Studien überwiegend in einer hohen TNF- α - und IL-6-Serumkonzentration. So muss bei der Analyse und Interpretation der im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Daten bedacht werden, dass es sich hier nicht um das Zellmaterial definierter Patientenpopulationen handelt, sondern dass für die Experimente Zellen gesunder Spender verwendet wurden. Die nicht erfolgte Induktion starker Zytokinfreisetzungen könnte somit zudem mit der deutlich geringeren Anzahl CD20⁺ B-Zellen, den Targetzellen für

Rituximab, im Vollblut gesunder Donoren im Vergleich zu beispielsweise Patienten mit CLL zusammenhängen. Auch andere Studien bestätigten bereits die Schwierigkeit diese seltenen, starken Reaktion nach Stimulation humaner Zellen mit Rituximab *in vitro* abzubilden (Finco *et al.*, 2014; Vessillier *et al.*, 2015; Walker *et al.*, 2011).

Insgesamt reagierte die Mehrheit der getesteten Donoren im Rahmen beider Methoden (Vollblut-CRA: bis zu 75 %, PBMC-CRA: bis zu 80 %) mit Zytokinsekretionen im unteren bis mittleren Konzentrationsbereich der Skala aller getesteter mAk. Diese Ergebnisse stimmen mit den bekannten klinischen Inzidenzen und deren Schweregrad – leichte bis moderate Reaktionen bei der Mehrheit der Patienten – nach erstmaliger Rituximab-Infusion überein.

OKT3 induzierte *in vitro* im Vollblut-CRA die zweitstärksten, im PBMC-CRA sogar mitunter die stärksten Reaktionen.

Bei OKT3 handelt es sich um ein gebräuchliches Analogon des therapeutischen, immunsuppressiven mAk Muromonab (Orthoclone OKT3®), der zur Behandlung akuter Abstoßungsreaktionen nach allogener Nieren-, Herz- und Lebertransplantation eingesetzt wird (Smith, 1996). Sein therapeutischer Wirkmechanismus besteht darin, den TCR/CD3-Komplex reifer T-Lymphozyten zu erkennen, durch seine Bindung zu blockieren und somit eine Immunreaktion zu inhibieren (Sgro, 1995). Neben seiner starken Immunogenität als muriner mAk im Patienten die Produktion von ADAs zu induzieren (Goldstein, 1987; Thistlethwaite *et al.*, 1988), ist die Anwendung von Muromonab zudem mit einem starken CRS assoziiert (Abramovicz *et al.*, 1989; Bugelski *et al.*, 2009; Dhir *et al.*, 2012; Gaston *et al.*, 1991; Grimaldi *et al.*, 2016; Römer *et al.*, 2011; Scherer *et al.*, 2010).

Die *in vitro* im Rahmen des Vollblut-CRAs detektierten Frequenzen positiver Reaktionen lagen bei allen Zytokinen, mit Ausnahme von IL-6, ab einer OKT3-Konzentration von 1 µg/ml bei ≥ 50 %. Im Fall von IL-6 reagierten erst bei maximaler OKT3-Konzentration 100 % der Donoren positiv. Unter Berücksichtigung des klinischen Potenzials von Muromonab zur Induktion eines starken CRS, lagen die medianen Konzentrationen der *in vitro* sezernierten Zytokine nach OKT3-Stimulation relativ niedrig. Bereits 1989 zeigten sich nach erster Administration von Muromonab bei ungefähr 50 % der Patienten Symptome, die mit einem ernsten CRS in Form einer starken Erhöhung von TNF-α und IFN-γ assoziiert waren (Chatenoud *et al.*, 1990; Sgro, 1995). Im Vollblut-CRA lagen die induzierten medianen Konzentrationen dieser beiden Zytokine nur minimal über denen, die durch MabThera induziert wurden. Diese Reaktionen würden folglich das bekannte klinische Nebenwirkungsprofil von Muromonab unterschätzen. Für TNF-α, IL-10 und IL-6 unterschieden sich die OKT3-induzierten Reaktionen erst bei der maximalen OKT3-Konzentration von 100 µg/ml sowohl in der Frequenz an *Respondern* als auch in der medianen Zytokinkonzentration von den Remicade- und MabThera-induzierten Reaktionen. Bei Betrachtung aller Graphen wird deutlich, dass die Sekretion der Zytokine IL-2 und IL-4

entscheidend für die Abgrenzung der OKT3-induzierten Reaktionen von denen durch die mAk Remicade und MabThera ist. Da diese Zytokine von aktivierten T-Lymphozyten, den Targetzellen von OKT3, sezerniert werden, spiegelt dieses Resultat den Wirkmechanismus des anti-CD3 Antikörpers wider. Auch für IFN- γ hätte folglich solch eine Reaktion erwartet werden können. Es ist jedoch zu bedenken, dass, während eine IL-2-Sekretion auf T-Zellen beschränkt ist, IFN- γ hingegen auch von anderen Zelltypen wie beispielsweise NK-Zellen produziert werden kann (Bugelski *et al.*, 2009). Dies erklärt, warum sich die OKT3-induzierten Reaktionen bei IFN- γ nicht ebenso deutlich von denen durch MabThera abgrenzen lassen.

Die in der vorliegenden Arbeit insgesamt niedrigen medianen Zytokinkonzentrationen im Vollblut-CRA nach OKT3-Stimulation können auf die geringe Anzahl vorhandener CD3⁺ T-Lymphozyten im Vollblut zurückgeführt werden. Um die OKT3-induzierten Reaktionen innerhalb des Vollblut-CRAs, in Anlehnung an sein klinisches Potenzial zur Induktion eines CRS, deutlicher von den Reaktionen therapeutischer Antikörper abzugrenzen, die mit einem schwachen bis moderaten CRS assoziiert sind, bedarf es vermutlich einer deutlich höheren Anzahl an getesteter Donoren. Zu einem vergleichbaren Fazit kamen auch Vessillier und Kollegen (Vessillier *et al.*, 2015). Sie errechneten auf Basis *in vitro* generierter Daten von zehn Donoren nach Muromonab-Stimulation, wie viele Donoren es letztendlich benötigt, um die Sensitivität dieses Assays zu erhöhen. Vorhandene Effekte sollten mit 90 %-iger Wahrscheinlichkeit detektiert werden und somit eine zuverlässige Unterscheidung zwischen einem schwachen, moderaten und schweren CRS ermöglichen. Hier stellte sich der Vollblut-CRA unter den getesteten Methoden mit einer Anzahl von 4519 zu testenden Donoren als die am wenigsten sensitive Methode heraus. Der PBMC-CRA (*wet-coat*) hingegen erwies sich für Muromonab, mit der kleinsten nötigen Anzahl zu testender Donoren (n=4), als die sensitivste Methode (Vessillier *et al.*, 2015).

Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte der PBMC-CRA sowohl in der Frequenz an *Respondern* als auch in den Konzentrationen der induzierten Zytokine deutlich stärkere Reaktionen auf OKT3 als der Vollblut-CRA. Während die maximalen medianen TNF- α - und IL-2-Konzentrationen nach OKT3-Stimulation unter denen der Studien von Vessillier *et al.* lagen (TNF- α : 1485,76 pg/ml vs. 25437 pg/ml; IL-2: 145,49 pg/ml vs. 547 pg/ml), überschritt die hier generierte IFN- γ -Konzentration die der veröffentlichten Studie um das 1,7-fache (Vessillier *et al.*, 2015). Ein Vergleich der Resultate einer OKT3-Stimulation der PBMCs mit den publizierten Daten der Firma Genentech nach Stimulation der PBMCs mit einem anti-CD3 Antikörper bei gleicher Methodik zeigte, dass sich die ermittelten Konzentrationen für den Großteil der Zytokine innerhalb der von Genentech generierten Konzentrationsspannen befanden (TNF- α : 7 – 1571 pg/ml; IL-10: < 5 – 683 pg/ml; IL-6: 10 – 4502 pg/ml; IL-2: < 5 – 632 pg/ml; IL-4: < 5 – 11 pg/ml) (Finco *et al.*, 2014). Lediglich IFN- γ lag in seiner Konzentration weit über der publizierten Konzentrationsspanne von < 5 – 118 pg/ml. Bei Betrachtung dieser

Konzentrationsspannen zeigt sich die große Varianz der generierten Daten. Dies macht es umso wichtiger, induzierte Reaktionen im Gesamtzusammenhang mit anderen therapeutischen Antikörpern bekannter Wirkungsstärke zu betrachten. Hierbei wird schließlich deutlich, dass der PBMC-CRA, im Gegensatz zum Vollblut-CRA, eine klarere Abgrenzung der OKT3-induzierten Reaktionen von den schwachen bis moderaten Reaktionen durch MabThera ermöglicht. Folglich scheint der PBMC-CRA die geeignetere der beiden getesteten Methoden zu sein, um Reaktionen durch OKT3 seinem bekannten klinischen Nebenwirkungsprofil gemäß abzubilden. Ein Grund für die höhere Sensitivität der PBMC-Methode für OKT3 kann zum einen die höhere Dichte an CD3⁺ T-Lymphozyten innerhalb der PBMC-Population im Vergleich zum Vollblut sein. Zum anderen kann auch die Art der Antigenpräsentation – über die Beschichtung der Wellböden mit dem mAk – Einfluss auf die induzierten Reaktionen haben. So existieren in Bezug auf den Mechanismus zur Induktion eines CRS durch Muromonab nur begrenzt Belege dafür, dass eine alleinige direkte Bindung des CD3-Oberflächenrezeptors auf T-Zellen zu deren Aktivierung und folglich zur Zytokinfreisetzung führen kann. In diesem Kontext zeigten die *in vitro* Experimente von Carpenter und Kollegen an unterschiedlichen anti-CD3 Konstrukten, dass sowohl ein mAk mit reduzierter FcR-Bindungsaffinität als auch ein F(ab')₂-Fragment desselben Antikörpers vergleichbare IFN- γ -Freisetzungen induzierten wie der nicht modifizierte mAk (Carpenter *et al.*, 2000). Dies ließe darauf schließen, dass eine alleinige Ligation von CD3 in Abwesenheit einer FcR-Bindung ausreichend wäre, um eine Zellaktivierung mit der Folge einer Zytokinfreisetzung auszulösen. Vielmehr wird jedoch angenommen, dass eine einfache Bindung des Targetantigens zwar zur Induktion eines CRS beiträgt, eine Kreuzvernetzung durch und Aktivierung von FcRs allerdings der entscheidendere Mechanismus zu sein scheint, der zu einer verstärkten Zellaktivierung der Target-T-Lymphozyten sowie von Nicht-Effektorzellen führt. So zeigte die Mehrheit veröffentlichter Studien einen Zusammenhang zwischen einer reduzierten FcR-Bindungsaffinität von anti-CD3 Antikörpern und einer reduzierten T-Zell-Aktivierung und Zytokinfreisetzung durch diese Zellen (Cole *et al.*, 1997; Tax *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2000). Bei der PBMC-Methode wurde diese Kreuzvernetzung der Fc-Anteile von OKT3, die zu einer gesteigerten Aktivierung der Target-T-Lymphozyten führt, durch die Immobilisierung dieses mAk an den Wellboden imitiert. Lediglich die gesteigerte Aktivierung von FcR-exprimierenden Nicht-Effektorzellen wird mittels dieser Methode nicht abgebildet. Dennoch scheint die Imitierung einer Kreuzvernetzung letztendlich eine höhere Zytokinfreisetzung zu ermöglichen als die im Vollblut vorhandenen FcR-exprimierenden Zellen. Die deutlich höhere Zytokinsekretion nach OKT3-Stimulation könnte daher sowohl ein Resultat des höheren Anteils der Targetzellen innerhalb der PBMC-Population als auch das einer erhöhten Targetzellaktivierung durch die Imitierung einer Kreuzvernetzung der Fc-Domäne des mAks sein. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Orientierung, in der der mAk letztendlich an die Platte gebunden wird, vorab nicht sichergestellt werden kann. Der mAk könnte in einer Orientierung

gebunden werden, welche die Zugänglichkeit der CD3-spezifischen variablen Regionen für eine Bindung an den CD3-Rezeptor der T-Lymphozyten erschwert und so die Aktivierung dieser Zellen negativ beeinflusst. Für eine Analyse der Orientierung des mAk nach Beschichtung der Wellböden könnte zukünftig ein CD3-spezifisches Fusionsprotein eingesetzt werden, dessen Bindung über einen ELISA detektiert wird.

Zusammengefasst induzierte OKT3 im PBMC-CRA mitunter die stärksten Reaktionen unter den analysierten mAk. Dies entspricht seinem bekannten klinischen Potenzial zur Induktion eines starken CRS. Zudem grenzten sich die Reaktionen deutlich von denen des therapeutischen Antikörpers MabThera ab, der in der Klinik das Potenzial zur Induktion eines schwachen bis moderaten CRS aufzeigte. Beim Vollblut-CRA lagen die induzierten Zytokinsekretionen in ihren Konzentrationen um ein Vielfaches niedriger und ließen sich lediglich bei den T-Zell-Zytokinen sowie bei maximaler OKT3-Konzentration von 100 µg/ml deutlich von den MabThera-induzierten Reaktionen unterscheiden. Dies liefert erste Hinweise auf das starke Potenzial von OKT3 zur Induktion eines CRS. Im Gesamtbild, insbesondere bei OKT3-Konzentrationen von 0,1, 1 und 10 µg/ml, könnte das Zytokinprofil im Vollblut-CRA allerdings zu einer Unterschätzung der OKT3-induzierten Reaktionen im Vergleich zu seinem klinischen Nebenwirkungsprofil führen.

Durch eine Stimulation mit ANC28.1 wurden im Rahmen des Vollblut-CRAs die stärksten Reaktionen induziert. Auch im PBMC-CRA stellte sich ANC28.1, gemeinsam mit OKT3, als potentester Stimulus für eine induzierte Zytokinfreisetzung heraus.

Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei ANC28.1 um ein Analogon des superagonistischen anti-CD28 Antikörpers TGN1412, der seit den Vorfällen im Rahmen einer klinischen Studie im Jahr 2006 mit der Induktion eines schweren CRS assoziiert ist. Dieses CRS wurde durch eine drastische Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IFN- γ , IL-8, IL-6 und IL-1 β sowie des Schlüsselzytokins einer CD3/CD28-Bindung, IL-2, charakterisiert. Als Reaktion auf den Anstieg proinflammatorischer Mediatoren war zudem die Konzentration des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 erhöht. Die höchsten Peak-Konzentrationen wurden innerhalb der klinischen Studie während der ersten vier Stunden nach TGN1412-Administration für IFN- γ (\geq 5000 pg/ml), IL-8 (ca. 5000 pg/ml), IL-1 β (ca. 5000 pg/ml), TNF- α (4675,9 pg/ml) und IL-2 (ca. 4200 pg/ml) verzeichnet, gefolgt von IL-6 (ca. 3500 pg/ml), IL-4 (ca. 2800 pg/ml) und IL-10 (ca. 2000 pg/ml) (Suntharalingam *et al.*, 2006). Obwohl die absoluten Konzentrationen im Vollblut-CRA der vorliegenden Arbeit meist unterhalb der im Patienten detektierten Zytokinkonzentrationen lagen, konnte ein vergleichbares Profil der relativen Veränderungen der Zytokinsekretionen nach ANC28.1-Stimulation abgebildet werden. Die höchsten Konzentrationen wurden hier bei IL-8 (ebenfalls ca. 5000 pg/ml, siehe *Heatmap*), IFN- γ (838,02 pg/ml), IL-6 (484,82 pg/ml) und IL-2 (117,57 pg/ml) verzeichnet. IL-2, das

Schlüsselzytokin einer TGN1412-Stimulation (Suntharalingam *et al.*, 2006; Vessillier *et al.*, 2015), nimmt auch innerhalb der vorliegenden *in vitro* Studien eine besondere Stellung ein. Als einziges der analysierten Zytokine wies IL-2 bereits ab einer ANC28.1-Konzentration von 1 µg/ml einen prozentualen Anteil an *Respondern* von 100 % auf. Zudem lag die sezernierte maximale IL-2-Konzentration ein 23,51-faches über der Konzentration, die durch eine Stimulation mit der Positivkontrolle induziert wurde. Dies spiegelt den Mechanismus von ANC28.1 als anti-CD28SA wider. Üblicherweise kann die alleinige Bindung des kostimulatorischen Rezeptors CD28 entweder durch seine natürlichen Liganden CD80/CD86 auf professionellen APCs oder durch einen agonistischen Antikörper, ohne simultane Beteiligung des TCR (TCR/MHC-Bindung) keine polyklonale T-Zell-Aktivierung initiieren. Im Gegensatz dazu ist ein superagonistischer mAk wie TGN1412 bzw. ANC28.1 in der Lage, ohne eine gleichzeitige Bindung des TCRs eine polyklonale Aktivierung und Proliferation der T-Lymphozyten zu initiieren, die letztendlich eine IL-2-Sekretion durch diese Zellen zur Folge hat (Luhder *et al.*, 2003; Siefken *et al.*, 1997; Tacke *et al.*, 1997). Eine Interpretation der generierten Daten hinsichtlich der induzierten Reaktionsstärken durch die anderen getesteten mAk untermauert nochmal das starke Potenzial von ANC28.1 zur Induktion eines CRS. So zeigte ANC28.1 ab einer Konzentration von 10 µg/ml in den meisten Fällen einen höheren prozentualen Anteil an *Respondern* als OKT3 in korrespondierenden Konzentrationen (10 µg/ml, 100 µg/ml). Auch die medianen Konzentrationen aller dargestellten Zytokine lagen nach ANC28.1-Stimulation ab einer Konzentration von 10 µg/ml über denen von OKT3. Darüber hinaus überstieg der prozentuale Anteil an *Respondern* den Anteil im Rahmen publizierter Studien (Wolf *et al.*, 2012). In den Studien von Wolf *et al.* wurde mit einem anderen TGN1412-Analogon (*TGN1412-like material*) bei vergleichbarer Methodik lediglich bei IL-8 ein Anteil positiver Reaktionen von 100 % erreicht. Bei IFN-γ, TNF-α und IL-4 lag dieser Anteil bei nur 20 – 25 %. Die nach 24-stündiger ANC28.1-Stimulation (5 µg/ml) detektierten mittleren Zytokinkonzentrationen (n=20) von TNF-α, IL-2 und IL-6 hingegen waren mit den generierten Daten der vorliegenden Arbeit (10 µg/ml ANC28.1, 48 Stunden) weitestgehend vergleichbar. IFN-γ wurde in der vorliegenden Arbeit in weitaus höheren Konzentrationen sezerniert, während die von Wolf *et al.* detektierten IL-4- und IL-10-Konzentrationen nicht erreicht wurden (Wolf *et al.*, 2012). Auch Bailey und Kollegen zeigten, dass die Methode des Vollblut-CRAs sensitiv genug ist, um Reaktionen auf ein TGN1412-Analogon (10 µg/ml) abzubilden, wenngleich die Konzentrationen des für diesen Mechanismus relevantesten Zytokins IL-2 sowie die Konzentrationen von IFN-γ im Vergleich zu den *in vitro* Studien der vorliegenden Arbeit deutlich niedriger lagen (Bailey *et al.*, 2013). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es sich bei dem in den Studien von Bailey *et al.* verwendeten mAk um ein *in-house* produziertes TGN1412-Analogon mit möglicherweise anderer superagonistischer Aktivität handelte. Die Konzentrationen von TNF-α, IL-10 und IL-4 waren weitestgehend vergleichbar.

Entsprechend bereits publizierter Studien war es mit dem *in vitro* Testsystem des Vollblut CRAs somit möglich, das starke Potenzial von ANC28.1 als TGN1412-Analogon zur Induktion eines schweren CRS abzubilden. In anderen Studien wiederum konnten im Rahmen eines Vollblut-CRAs *in vitro* nur unzureichende Reaktionen auf TGN1412 oder ein Analogon abgebildet werden. So zeigten die Forschungsergebnisse von Vessillier und Kollegen, dass ein Vollblut-CRA zur Detektion einer TGN1412-induzierten Zytokinfreisetzung nicht prädiktiv genug ist. Zwar könne dieser Assay mit höherer Wahrscheinlichkeit TGN1412- als OKT3-induzierte Reaktionen abbilden, statistisch gesehen benötige es jedoch mindestens 52 Donoren, um mit 90 %-iger Wahrscheinlichkeit vorhandene Reaktionen korrekt zu detektieren. Bei kleinerer Anzahl getesteter Donoren fehle es diesem Testsystem an der dynamischen Spannweite, um zwischen einem schwachen, moderaten und ernsten CRS differenzieren zu können (Vessillier *et al.*, 2015). Die vorliegenden Ergebnisse des Vollblut-CRAs zeigen zwar stärkere Reaktionen auf eine ANC28.1- als auf eine OKT3-Stimulation, dennoch widersprechen die Ergebnisse klar der finalen Aussage von Vessillier *et al.* In der vorliegenden Arbeit konnten die ANC28.1-induzierten Reaktionen durchaus von den Reaktionen durch MabThera abgegrenzt und so zwischen dem Potenzial zur Induktion eines schweren bzw. moderaten CRS differenziert werden. Ein wesentlicher Grund für diese divergierenden Schlussfolgerungen könnte sein, dass die Konzentrationen der Zytokine IFN- γ und IL-2 bei Vessillier *et al.* nach Stimulation mit 5 $\mu\text{g/ml}$ TGN1412 deutlich unter denen lagen, die innerhalb der vorliegenden Arbeit mit 10 mg/ml ANC28.1 detektiert werden konnten (IFN- γ : < 10 pg/ml vs. 838,02 pg/ml ; IL-2: < 25 pg/ml vs. 88,90 pg/ml). Lediglich die TNF- α -Konzentration lag über der TNF- α -Konzentration der vorliegenden Arbeit.

Während der Vollblut-CRA in der vorliegenden Arbeit bereits eine Identifizierung der Gefahr eines schweren CRS, welches von ANC28.1 als TGN1412-Analogon ausgeht, ermöglichte, induzierte dieser mAk im PBMC-CRA tendenziell stärkere Reaktionen. Diese zeigten sich sowohl in Form einer erhöhten Frequenz an *Respondern* als auch in den maximalen medianen Konzentrationen der Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2. Mit Ausnahme von IL-6 induzierte ANC28.1 spätestens bei maximaler Konzentration bei allen Zytokinen eine *Responder*-Frequenz von 100 %. Dies entspricht der bekannten klinischen Inzidenz zur Induktion eines CRS nach TGN1412-Administration (Suntharalingam *et al.*, 2006). Besonders interessant ist der Aspekt, dass die maximale IL-2-Sekretion durch PBMCs nach ANC28.1-Stimulation ein 7-faches über der nach OKT3-Stimulation lag. Ähnliche Ergebnisse zeigten die Studien von Vessillier *et al.*, in denen IL-2 nach TGN1412-Stimulation der PBMCs in einer 10-fach höheren Konzentration detektiert wurde als nach Stimulation mit Muromonab (Vessillier *et al.*, 2015). Darüber hinaus lag die in der vorliegenden Arbeit detektierte IL-2-Konzentration das 8,7-fache über der maximalen Konzentration, die innerhalb des Vollblut-CRAs sezerniert wurde. Auch die maximalen IFN- γ - und TNF- α -Konzentrationen überstiegen die maximalen Konzentrationen in

der Vollblut-Methode um ein Vielfaches (IFN- γ : 1,3-fach, TNF- α : 23,8-fach). Die Peak-Konzentrationen, die in der klinischen Studie nach TGN1412-Administration im Serum der Patienten gemessen wurden, wurden jedoch nicht erreicht. Bei IFN- γ und IL-2 lagen die *in vitro* sezernierten Konzentrationen ein 4,7-faches, bei TNF- α ein 6,0-faches darunter. Obwohl die maximalen Konzentrationen von IL-10, IL-6 und IL-4 im PBMC-CRA die des Vollblut-CRAs unterschritten, erwies sich der PBMC-CRA für die Abbildung eines ANC28.1-induzierten, schweren CRS als sensitivere Methode. Ein Grund dieser höheren Sensitivität für ANC28.1-induzierte Reaktionen kann – wie auch bei OKT3 – die höhere Dichte der Targetzellen (in diesem Fall CD28⁺ T-Lymphozyten) innerhalb der PBMC-Population im Vergleich zum Vollblut sein. Vor allem spielt bei TGN1412 bzw. ANC28.1 jedoch der Mechanismus, der zur Induktion eines CRS führt, eine entscheidende Rolle. So stellte sich heraus, dass FcR-vermittelte Kreuzvernetzungen die stimulatorische Aktivität von TGN1412 erst ermöglichen (Hünig, 2016). Präklinische Studien bewiesen bereits die beabsichtigt fehlende Fähigkeit von TGN1412, Funktionen wie ADCC oder CDC zu vermitteln. Es zeigte sich jedoch, dass Interaktionen dieses mAk mit Fc γ RII auf B-Zellen und Monozyten seine T-Zell-aktivierenden Eigenschaften fördern (Bartholomaeus *et al.*, 2014; Hussain *et al.*, 2015). Diese Kreuzvernetzung wird im Fall des PBMC-CRAs *in vitro* durch die Immobilisierung von ANC28.1 an den Wellboden simuliert und kann somit zu einer erhöhten Zytokinsekretion infolge einer gesteigerten Zellaktivierung führen (Findlay *et al.*, 2010; Findlay *et al.*, 2011a; Stebbings *et al.*, 2007; Vessillier *et al.*, 2015). Diese Kreuzvernetzung wurde in der Vergangenheit *in vitro* nicht nur durch die Immobilisierung der Antikörper an den Wellboden, sondern ebenso durch Kopplung der mAk an Protein A-Beads (Walker *et al.*, 2011) oder durch Kokultivierung von PBMCs mit einem Monolayer aus Endothelzellen erreicht (Dhir *et al.*, 2012; Findlay *et al.*, 2011a,b). Ein Vergleich der Ergebnisse der ANC28.1-Stimulation im Vollblut-CRA mit denen des PBMC-CRAs lässt die Schlussfolgerung zu, dass die simulierte Kreuzvernetzung innerhalb der PBMC-Methode einen stärkeren Einfluss auf eine gesteigerte Zellaktivierung zu haben scheint als die Fc γ RII-exprimierenden B-Lymphozyten und Monozyten im Vollblut.

Zusammenfassend war es sowohl mit dem Vollblut- als auch mit dem PBMC-CRA möglich, das klinische Potenzial des TGN1412-Analogons ANC28.1 zur Induktion eines schweren CRS *in vitro* abzubilden. Obwohl die Zytokinkonzentrationen, die in der klinischen Studie im Jahr 2006 im Patienten nach TGN1412-Administration detektiert wurden, in keinem der beiden Assays erreicht wurden, grenzten sich die durch ANC28.1 induzierten Reaktionen deutlich von denen durch MabThera ab. Dies entspricht dem klinischen Potenzial der jeweiligen Antikörper zur Induktion eines schweren bzw. leichten bis moderaten CRS. Dass das Potenzial von ANC28.1 zur Induktion starker Zytokinfreisetzung in der vorliegenden Arbeit insbesondere bei höheren Konzentrationen (ab 10 μ g/ml) deutlich wurde, kann mit dem Wirkmechanismus dieses mAk erklärt werden. Während durch geringe TGN1412-Konzentrationen lediglich die CD4-

Subpopulation der T_{reg}-Zellen selektiv aktiviert wird, aktivieren höhere Konzentrationen hingegen auch konventionelle T-Lymphozyten (Hünig, 2016).

Sowohl der Vollblut-CRA als auch der PBMC-CRA ermöglichte eine Identifikation der Gefahr einzelner mAk zur Induktion eines CRS *in vitro* gemäß ihrem bekannten klinischen Potenzial. Die vorliegenden Ergebnisse, insbesondere im Fall von OKT3, verdeutlichen dennoch den Einfluss, den die Wahl der Methode auf das Ausmaß der induzierten Reaktionen haben kann. Im Fokus steht hier vor allem der Wirkmechanismus des jeweiligen therapeutischen Antikörpers und damit einhergehend die Dichte der Targetzellen innerhalb der zu analysierenden Zellpopulation. Auch der therapeutische Anwendungsbereich eines mAk spielt eine wichtige Rolle. So richten sich beispielsweise Antikörper, die bei einer Krebstherapie eingesetzt werden, gegen spezifische Tumorantigene. Diese Epitope sind, verglichen mit gesunden Donoren, im Patienten in deutlich höherer Dichte vertreten, sodass dies ebenfalls ein Aspekt ist, der bei der Wahl der *in vitro* zu analysierenden Zellpopulation bedacht werden sollte. Erwartungsgemäß wurde bei einem Vergleich der ANC28.1-induzierten *in vitro* Reaktionen mit den veröffentlichten klinischen Daten nach TGN1412-Administration zudem deutlich, dass sich die absoluten Zytokinlevel nicht 1:1 auf ein *in vitro* Modell übertragen lassen. Das Optimum, welches mit diesen *in vitro* Methoden erreicht werden kann, ist somit ein Ranking der Prüfmuster (Biologika) im Vergleich zu bekannten Induktoren. Folglich können die im Rahmen dieser Arbeit etablierten *in vitro* CRAs zwar nicht zur Risikoquantifizierung für spätere Reaktionen im Patienten herangezogen werden, dienen aber als wertvolles Screening-Tool zur präklinischen Gefahrenidentifikation (*hazard identification*) eines potenziellen CRS im Patienten.

4.2.2 Clusteranalyse als Hilfsmittel zur Gefahrenidentifikation

Wie im vorherigen Kapitel herausgestellt wurde, stellen *in vitro* CRAs ein wertvolles Screening-Tool zur präklinischen Vorhersage des Potenzials von mAk zur Induktion eines CRS im Patienten dar. Mit den in der vorliegenden Arbeit etablierten Methoden konnte das bekannte klinische Potenzial verschiedener mAk *in vitro* abgebildet und zwischen den Schweregraden einer ausbleibenden, einer leichten bis moderaten und einer schweren induzierten Zytokinfreisetzung unterschieden werden. Die Analyse dieser komplexen Daten der Multiplex-Zytokinanalyse ist jedoch auf die Darstellung einzelner Zytokine limitiert und deren Interpretation recht mühsam und zeitaufwendig. Infolgedessen bedarf es einer geeigneten Analyse und Darstellung der generierten Daten, die eine vereinfachte Identifikation kritischer Reaktionen ermöglichen. Hierfür wurden die generierten Daten im Anschluss mittels der hierarchischen Clusteranalyse (HCA) reanalysiert. Üblicherweise wird die HCA zur Analyse von Genexpressionsdaten angewandt, um Expressionsprofile auf Basis ihrer Ähnlichkeit zu gruppieren (Gollub und Sherlock, 2006). Im Fall der Zytokindaten ermöglichte die HCA mit

einem einzigen *Readout* donorübergreifend die zeitgleiche Betrachtung aller zehn analysierten Zytokine sowie eine schnelle Gruppierung der durch die einzelnen mAk induzierten Reaktionen in Form eines Dendrogrammes, basierend auf vergleichbaren Zytokinmustern und Induktionsstärken.

Die Ergebnisse dieser Reanalyse stimmen mit den Ergebnissen der im vorherigen Kapitel diskutierten Zytokindaten nach *in vitro* Stimulation mit den unterschiedlichen mAk überein. Die Dendrogramme ermöglichen eine schnelle und schlüssige Unterscheidung der verschiedenen mAk gemäß ihrem Potenzial zur Induktion eines CRS im Patienten. Auch die zuvor diskutierten Unterschiede in den induzierten Reaktionen in Abhängigkeit von der gewählten Methode werden deutlich. So zeigt das aus der *Heatmap* für die Vollblut-Methode resultierende Dendrogramm einen separaten Hauptzweig für die Positivkontrolle sowie die mAk, die in der Klinik mit einem starken CRS assoziiert sind: ANC28.1 als TGN1412-Analagon (10 und 100 µg/ml) sowie OKT3 als Muromonab-Analagon (lediglich 100 µg/ml). Im Vergleich hierzu ist dieser Hauptzweig für den PBMC-CRA nochmal um OKT3 in den Konzentrationen 1 und 10 µg/ml erweitert, was die höhere Sensitivität dieses Assays für OKT3 abbildet. Besonders interessant ist die Unterteilung des zweiten Hauptzweigs in seine zwei Untergruppen. Eine dieser Untergruppen enthielt die mAk, die die zweitstärksten Zytokinsekretionen induzierten. Während diese Untergruppe für die Vollblut-Methode unter anderem alle getesteten Konzentrationen von MabThera enthielt, wurde in der gleichen Untergruppe des PBMC-CRAs lediglich die maximale MabThera-Konzentration eingruppiert. Die übrigen MabThera-Konzentrationen befanden sich im Dendrogramm in der Untergruppe mit Erbitux und Remicade, also den mAk, die nicht mit einem CRS assoziiert sind. Diese Einstufung auf Basis des PBMC-CRAs entspricht nicht dem klinischen Potenzial von MabThera. Der Vollblut-CRA ist daher in diesem Fall die geeignetere Methode, um den mAk MabThera gemäß seinem bekannten klinischen Potenzial zur Induktion eines leichten bis moderaten CRS zu klassifizieren. Dieser Unterschied konnte innerhalb der vorherigen Analyse (Kap. 3.3.2, Abb. 47, 48), in der lediglich einzelne Zytokine betrachtet wurden, nicht in dieser Deutlichkeit aufgezeigt werden. Ein weiterer interessanter Aspekt innerhalb der zweiten Untergruppe des zweiten Hauptzweiges ist der, dass dieser für den Vollblut-CRA neben allen Konzentrationen der mAk, die nicht mit einem CRS assoziiert sind auch ANC28.1 in niedrigster Konzentration enthält. Im Vergleich hierzu wird ANC28.1 im PBMC-CRA auch in niedrigster Konzentration in die Gruppe der leichten bis moderaten Zytokinsekretionen eingeordnet (erste Untergruppe des zweiten Hauptzweiges). Dies unterstreicht, dass mittels beider Methoden die Gefahr, welche von ANC28.1 als TGN1412-Analagon ausgeht, identifiziert werden kann, die PBMC-Methode jedoch eine minimal höhere Sensitivität für diesen superagonistischen anti-CD28 mAk aufweist.

Eine weiter vereinfachte Darstellung der Ergebnisse auf Basis der HCA stellt die Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*; PCA) dar. Auch mit dieser Darstellung ließen sich die sogenannten *high risk* Antikörper ANC28.1 und OKT3 als solche identifizieren. Auch die erhöhte Sensitivität des PBMC-CRAs für OKT3 im Vergleich zum Vollblut-CRA wird deutlich. Weitaus schwieriger gestaltet sich die Interpretation der Daten bei der Unterscheidung von mAk, die keine Gefahr darstellen von solchen mit dem Potenzial zur Induktion von leichten bis moderaten Reaktionen. Zwar lassen sich die durch die maximale MabThera-Konzentration induzierten Reaktionen innerhalb der PBMC-Methode auf Basis der PCA noch verhältnismäßig leicht als moderate Reaktionen identifizieren, schwieriger gestaltet es sich allerdings bei der Vollblut-Methode. In diesem Fall geben die Dendrogramme der HCA mehr Aufschluss.

Der CRA dient somit als wertvolles Screening-Tool, welches bereits in der frühen Entwicklung eines mAks, potenzielle Gefahren der Induktion einer systemischen Zytokinfreisetzung identifizieren kann. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die HCA, ein analytisches Tool welches eigentlich der Analyse von Genexpressionsdaten dient, auch für komplexe immunologische Daten wie induzierte Zytokinsekretionsprofile angewandt werden kann. Die Gruppierung der Zytokindaten basierend auf vergleichbaren Sekretionsstärken und Mustern sowie die Darstellung als Dendrogramme erleichtert die Interpretation der komplexen Datenmengen. Obwohl der CRA als Screening-Tool nicht dafür ausgelegt ist, Risiken zu quantifizieren und Schwellenwerte zu generieren, oberhalb derer Reaktionen im Patienten als kritisch zu betrachten wären, ermöglicht diese Art der Analyse die Identifikation der Gefahr und eine Charakterisierung der im Menschen zu erwartenden Reaktionen. Eine wichtige Voraussetzung für die Interpretation generierter Daten ist lediglich das Mitführen von bekannten negativen sowie *low* und *high risk* Antikörpern, um das Gefahrenpotenzial, das vom zu testenden Antikörper ausgeht verlässlich zu kategorisieren. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass negative Ergebnisse im CRA keine 100 %-ige Sicherheit geben.

4.3 *In vitro* Modelle zur Detektion potenzieller Immunogenität von Biologika

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der Untersuchung geeigneter humaner *in vitro* Methoden, um potenzielle immunogene Reaktionen durch Biologika bereits in der frühen Entwicklungsphase dieser Biopharmazeutika zu identifizieren. Im Fokus steht zum einen die Induktion einer klassischen Immunreaktion in Form einer Initiierung antigenspezifischer Reaktionen durch T-Lymphozyten und zum anderen die Induktion einer akuten Zytokinfreisetzung, die als *Cytokine Release Syndrom* (CRS) bezeichnet wird.

Sowohl in den Experimenten zur Etablierung eines *in vitro* Kokultursystems zur Detektion antigenspezifischer T-Zell-Reaktionen als auch in denen zur Etablierung eines *Cytokine Release Assays* wurde deutlich, dass die Vorhersage immunogener Reaktionen von einer Vielzahl von Faktoren abhängig ist bzw. beeinflusst wird. Zu diesen Faktoren zählten bei beiden Testsystemen nicht nur das verwendete Zellmaterial (gesunder Donor vs. Patient; Inter-Donor-Variabilitäten), sondern auch die Bindungsspezifität des zu testenden Biopharmazeutikums (*Mode of action*) und die damit einhergehende direkte Aktivierung von Targetzellen sowie Interaktionen mit (induzierten) Rezeptoren und Zytokinen.

Beim Testsystem der *in vitro* Kokultur zur Detektion von Reaktionen auf die xenogenen Anteile von Biologika stellten weitere Faktoren, wie die Wahl der zu analysierenden Endpunkte, unterschiedliche Kinetiken in Abhängigkeit vom analysierten Endpunkt (Stimulations- und Analysezeitpunkte) und fehlende *Danger*-Signale eine zusätzliche Herausforderung dar. Artifizell zugesetzte *Danger*-Signale hingegen brachten das Problem hervor, die antigenspezifischen von den inflammatorischen Reaktionen abzugrenzen und erhöhten die Komplexität des Systems. Es zeigte sich, dass Substanzmodifikationen wie Aggregationen ebenfalls ein solches *Danger*-Signal darstellen und potenziell immunogene, aber auch unspezifische, inflammatorische Reaktionen dieser modifizierten Biologika bewirken können. Diese Faktoren verdeutlichen die Grenzen eines *in vitro* Systems bei der Abbildung komplexer immunologischer Reaktionen. Eine erweiterte Kokultur mit mehreren Restimulationszyklen mit dem spezifischen Antigen zeigte zwar Tendenzen einer antigenspezifischen Sekundärreaktion, dennoch war es nicht möglich, ein standardisiertes *in vitro* Testsystem zu etablieren, um antigenspezifische Reaktionen für die verschiedenen Biologika zuverlässig vorherzusagen. Hier könnten komplexere, dreidimensionale *in vitro* Modelle wie der huALN (Giese *et al.*, 2010) zukünftig eine Möglichkeit darstellen, die humane Immunreaktion auf Biologika im Rahmen einer Langzeitkultivierung mit multiplen Antigen-Restimulationen *in vitro* abzubilden. Aber auch für dieses System ist zu vermuten, dass die Kulturbedingungen für jedes Prüfmuster individuell angepasst werden müssen.

Bei den Testsystemen des *Cytokine Release Assays* hingegen war es sowohl mit der Vollblut- als auch mit der PBMC-Methode möglich, das bekannte klinische Potenzial einzelner mAk zur Auslösung akuter Zytokinfreisetzungen *in vitro* zuverlässig abzubilden. Allerdings zeigte sich auch hier, dass die Wahl der Methode – in Abhängigkeit vom Wirkmechanismus und therapeutischen Anwendungsbereich des jeweiligen therapeutischen Antikörpers – Einfluss auf das Ausmaß der induzierten Reaktionen haben kann.

Zusammenfassend stellte sich die *in vitro* Kokultur somit als nur bedingt geeignet heraus, um die komplexen, immunogenen Reaktionen auf die xenogenen Anteile von Biologika verlässlich abzubilden. Wahrscheinlich müssten die Bedingungen für jedes Prüfmuster in Abhängigkeit von Dosierung, Kinetik, Zellpopulationen, Verteilung der Epitope und Rezeptoren, Endpunkte usw. optimiert werden, um sinnvolle und zuverlässige Aussagen für das jeweilige Biologikum treffen zu können. Die etablierten *Cytokine Release Assays* hingegen können zukünftig als wertvolles Screening-Tool zur präklinischen Gefahrenidentifikation eines potenziellen CRS im Patienten herangezogen werden. Die Teststrategie sollte hierfür immer spezifisch auf jedes Biopharmazeutikum und seinen Wirkmechanismus angepasst werden und die Testung einer ausreichenden Anzahl an Donoren gewährleisten sein, um mögliche Nebenwirkungen aufgrund von Interaktionen mit dem Immunsystem zuverlässig vorhersagen zu können. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass das Testsystem in jedem Fall nur ein relatives Ranking in Bezug zu (Standard-) Biologika mit bekanntem Potenzial zur Induktion immunogener Reaktionen darstellen kann. Es dient somit lediglich einer „*hazard identification*“ und nicht einer Risikoermittlung.

5 Zusammenfassung

Biopharmazeutika, auch als Biologika bezeichnet, haben das Potenzial im Patienten unerwünschte Immunreaktionen auszulösen (*adverse drug reactions*; ADRs). Diese Reaktionen können von der Reduktion der Wirksamkeit der Biopharmazeutika bis hin zu schweren, lebensbedrohlichen Nebenwirkungen reichen. Die Vorhersagbarkeit immunogener Reaktionen auf Basis präklinischer Studien ist bislang jedoch limitiert. Traditionelle Tiermodelle sind aufgrund der Xenogenität humaner Biopharmazeutika im Tier und existierender Speziesunterschiede für die Vorhersage potenzieller Immunogenität im Menschen nur begrenzt aussagekräftig. In der immuntoxikologischen Forschung ist hier die Ergänzung der *in vivo* Studien um geeignete humane *in vitro* Screening-Modelle von Interesse, um Biologika bereits in der frühen Entwicklungsphase auf ihr immunogenes Potenzial im Menschen zu untersuchen und mögliche Gefahren zu identifizieren. Eine Alternative stellt der Gebrauch speziesspezifischer Analoga von humanen Biologika, sogenannter „*Surrogates*“, dar. Solche Untersuchungen werden von den Behörden zwar problemlos anerkannt, sind jedoch sehr aufwendig und komplex, da alle Eigenschaften dieser Surrogate wie beispielsweise Bindungsaffinitäten und –spezifitäten, Wirksamkeit und Pharmakokinetik denen der jeweiligen Prüfmuster entsprechen müssen.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand deshalb die Entwicklung und Evaluierung von zwei humanen *in vitro* Testsystemen zur Detektion immunstimulierender Wirkungen durch Biologika wie Modell-Antigene und therapeutische monoklonale Antikörper. Ziel der Untersuchungen war eine Aussage darüber zu treffen, inwiefern diese *in vitro* Modelle zur Identifizierung immunogener Reaktionen geeignet sind und zur Erstellung eines Immunogenitätsprofils des Arzneimittelkandidaten beitragen können.

Das erste *in vitro* Modell adressiert ADRs in Form einer Produktion antigenspezifischer Antikörper gegen den Wirkstoff (*Anti-Drug*-Antikörper) als Reaktion auf die xenogenen Anteile eines Biologikums. Im Gegensatz zu *in vivo* Studien liegt der Fokus dieses *in vitro* Testsystems jedoch auf früheren Endpunkten. Es handelt sich um ein zweidimensionales Kokultursystem, bestehend aus humanen dendritischen Zellen und T-Lymphozyten, in dem die Aktivierung von dendritischen Zellen und eine darauf folgende Initiierung antigenspezifischer Reaktionen von T-Lymphozyten abgebildet werden soll. Hierfür wurde zunächst ein Protokoll zur Differenzierung dendritischer Zellen aus Monozyten des humanen Vollblutes etabliert. Nach antigenspezifischer Reifung wurden diese Zellen mit autologen CD4⁺ T-Lymphozyten kultiviert und die Induktion primärer und sekundärer Immunreaktionen auf das Antigen analysiert. Die Induktion einer Primärreaktion auf Biologika wie Modell-Antigene (KLH, OVA) und (therapeutische) monoklonale Antikörper konnte im Rahmen dieser *in vitro* Kokultur nicht eindeutig detektiert werden. Eine besondere Herausforderung stellten endotoxische Substanzverunreinigungen und

zusätzlich artifiziell zugesetzte *Danger*-Signale (LPS) dar. In Anlehnung an die *in vivo* Situation induzierten diese auch *in vitro* primäre Immunreaktionen in Form eines veränderten Oberflächenmarkerprofils dendritischer Zellen und einer anschließend initiierten T-Zellaktivierung, ermöglichten jedoch keine Abgrenzung der antigenspezifischen von einer inflammatorischen Reaktion. Auch Substanzmodifikationen wie Aggregationen stellten in dem untersuchten *in vitro* Kokultursystem ein solches *Danger*-Signal dar und waren in der Lage primäre, inflammatorische und vermutlich auch spezifische Immunreaktionen *in vitro* zu induzieren. Im Gegensatz zur Primärreaktion brachte das erweiterte *in vitro* Kokultursystem, mit zwei Restimulationszyklen zur Analyse der Sekundärantwort auf das Modell-Antigen KLH, Tendenzen einer antigenspezifischen Reaktion hervor. Diese zeigte sich in einer verstärkten Sekretion relevanter T-Zell-Zytokine sowie im Zelltod dendritischer Zellen. Hinsichtlich der gewonnenen Ergebnisse im Rahmen der *in vitro* Kokultur, bedarf es noch einer Vielzahl ergänzender Untersuchungen und Modellerweiterungen, um die komplexen, immunogenen Reaktionen auf die xenogenen Anteile von Biologika zukünftig verlässlich abbilden zu können.

Ein weiteres humanes *in vitro* Testsystem zur Detektion potenzieller Immunogenität von Biologika stellt der *Cytokine Release Assay* (CRA) dar. Dieser befasst sich mit dem akuten Effekt einer systemischen Zytokinfreisetzung (*Cytokine Release Syndrom*), welcher in der Klinik als adverse Reaktion auf therapeutische monoklonale Antikörper auftreten kann. Bis heute besteht in der Forschung kein Konsens darüber, welche Methode für eine präklinische Evaluierung am besten geeignet ist. Zur Etablierung des CRAs wurden in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Assayformate untersucht: die Vollblut- und die PBMC-Methode. Während die zu testenden monoklonalen Antikörper innerhalb der Vollblut-Methode in löslicher Form zugegeben wurden, erfolgte die Präsentation an PBMCs in immobilisierter, plattengebundener Form. Für beide Methoden wurden bestmögliche Parameter ermittelt, die es ermöglichten, das bekannte klinische Potenzial der getesteten monoklonalen Antikörper zur Auslösung akuter Zytokinfreisetzungen im Patienten zuverlässig *in vitro* abzubilden. Die Untersuchungen zeigten zudem, dass die Wahl der Methode selbst Einfluss auf das Ausmaß der induzierten Reaktionen haben kann. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit, eine Teststrategie in Abhängigkeit vom Wirkmechanismus und therapeutischen Anwendungsbereich des therapeutischen Antikörpers zu definieren.

Antigenspezifische Reaktionen auf xenogene Anteile von Biologika stellen komplexe, immunologische Reaktionen dar, die in dem untersuchten zweidimensionalen *in vitro* Kokultursystem nur bedingt abgebildet werden konnten. Der im Rahmen dieser Dissertation etablierte *Cytokine Release Assay* hingegen erwies sich als wertvolles Screening-Tool und wird mittlerweile zur präklinischen Gefahrenidentifikation eines potenziellen *Cytokine Release Syndroms* eingesetzt.

6 Summary

Biopharmaceuticals, also known as biologics, have the potential to induce unwanted immune reactions in patients termed adverse drug reactions (ADRs) resulting in not only compromised therapeutic efficacy but also potential life-threatening side effects. Until now, immunogenicity of protein therapeutics is difficult to predict in preclinical studies. Due to the xenogenic origin of human biopharmaceuticals in animals and existing species differences traditional animal models are of limited value, only. Therefore, additional human *in vitro* screening methods are of great interest in immunotoxicological research to investigate the immunogenic potential of biologics and to identify potential hazards already in early development phases. Alternatively, the use of species-specific analogous products – so called “surrogates” – can be considered in order to investigate the immunogenic potential of a drug candidate. The use of surrogates is generally accepted by regulatory agencies; however, the need to demonstrate sufficient comparability to the actual clinical molecule in all main properties (e.g. binding affinity and specificity, efficacy and pharmacokinetics) leads to higher expenditures.

Here, two human *in vitro* test systems were evaluated for the detection of immunostimulatory reactions caused by biologics such as model antigens and therapeutical monoclonal antibodies. The main goal was the identification of potential hazards that can further contribute to preparing an immunogenicity profile of the respective biologic.

The first *in vitro* model addresses ADRs in the form of anti-drug antibody (ADA) production resulting from the interaction of immune competent cells with biologics of xenogenic origin. Unlike existing *in vivo* studies, the current *in vitro* model is focusing on earlier endpoints within the development of immunogenicity. The model consists of a 2D-co-culture system of human dendritic cells and T lymphocytes. It detects the activation of dendritic cells as well as the following initiation of antigen-specific reactions by T cells. First of all, monocytes were isolated from human whole blood and differentiated to dendritic cells. After antigen-specific maturation, monocyte-derived dendritic cells were cultivated with autologous CD4⁺ T lymphocytes and the induction of primary and secondary immune response was analyzed. Evidence for the induction of primary immune reactions to biologics such as model antigens (KLH, OVA) and (therapeutic) monoclonal antibodies could not be clearly detected. Furthermore, endotoxic contaminations and artificially added danger signals (LPS) led to a significant challenge. In accordance with *in vivo* settings, these stimulations induced a primary immune reaction *in vitro* characterized by altered surface marker expression on dendritic cells followed by an initiated T cell activation. However, antigen-specific and inflammatory response could not be differentiated. Additionally, protein modification such as aggregate formation represented a danger signal to immune cells within the investigated *in vitro* co-culture system. Nevertheless, primary inflammatory, probably also specific immune reactions could be detected after stimulation with aggregated monoclonal

antibodies. In contrast, marked effects with tendencies of an antigen-specific secondary immune reaction were detected within the extended co-culture test system after two re-stimulation cycles using the model antigen KLH. These reactions were characterized by an increased secretion of relevant T cell cytokines and dendritic cell death. Overall, further investigations are still needed to reliably detect and predict such complex immune reactions to biologics of xenogenic origin *in vitro*.

Another human *in vitro* model for the detection of potential immunogenicity of biologics is the *Cytokine Release Assay* (CRA). This assay reflects the acute effect of systemic cytokine release (termed as *Cytokine Release Syndrome*), which can occur as adverse infusion-related reactions in patients during monoclonal antibody therapy. Currently, there is no consensus regarding which method is the most appropriate to evaluate preclinical safety of novel monoclonal antibody therapeutics. Therefore, two different assay formats were investigated: the *Whole Blood Assay* and the *PBMC Assay*. In the *Whole Blood Assay*, monoclonal antibodies are presented to cells in solution while the *PBMC Assay* takes place in solid-phase with immobilized antibodies. For both *in vitro* assays, optimal parameters were determined to reliably detect the clinically known potential of tested monoclonal antibodies to induce cytokine release in humans. Moreover, the results showed an impact of the applied assay itself on the extent of the induced reactions and therefore the importance of defining a test strategy based on the mode of action and therapeutic indication of the respective monoclonal antibody.

In summary, this work showed that the investigated 2D *in vitro* co-culture test system seems to be of limited suitability for investigating complex antigen-specific reactions to biologics of xenogenic origin. The established *Cytokine Release Assay*, however, has proven to be a valuable screening tool and, now, it is applied for preclinical hazard identification of potential *Cytokine Release Syndrome*.

Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K., Lohr, J., Knoechel, B., *et al.* (2004). T cell tolerance and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 3(7-8):471–475.
- Abbas, A.K., Murphy, K.M., Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383(6603):787–793.
- Abramovicz, D., Schandene, L., Goldman, M., *et al.* (1989). Release of tumor necrosis factor, interleukine-2 and gamma-interferon in serum after injection of OKT3 monoclonal antibody in kidney transplant recipients. *Transplantation* 47(4):606–608.
- Aderem, A., Ulevitch, R.J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406(6797):782–787.
- Aderem, A., Underhill, D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17:593–623.
- Aerts-Toegaert, C., Heirman, C., Tuyaerts, S., *et al.* (2007). CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol* 37(3):686–695.
- Agarwal, A., Vieira, C.A., Book, B.K., *et al.* (2004). Rituximab, anti-CD20, induces in vivo cytokine release but does not impair ex vivo T-cell responses. *Am J Transplant* 4(8):1357–1360.
- Ahn, J.S., Agrawal, B. (2005). IL-4 is more effective than IL-13 for in vitro differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells. *Int Immunol* 17(10):1337–1346.
- Allsopp, C.E., Nicholls, S.J., Langhorne, J. (1998). A flow cytometric method to assess antigen-specific proliferative responses of different subpopulations of fresh and cryopreserved human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods* 214(1-2):175–186.
- Alt, F.W., Oltz, E.M., Young, F., *et al.* (1992). VDJ recombination. *Immunol Today* 13(8):306–314.
- Anderson, P.J. (2005). Tumor necrosis factor inhibitors: clinical implications of their different immunogenicity profiles. *Semin Arthritis Rheum* 34(5 Suppl1):19–22.
- Andersson, J., Edelman, G.M., Möller, G., *et al.* (1972). Activation of B lymphocytes by locally concentrated concanavalin A. *Eur J Immunol* 2(3):233–235.
- Antonelli, G. (1997). In vivo development of antibodies to interferon: an update to 1996. *J Interferon Cytokine Res* 17:S39–46.
- Ardavin, C., Wu, L., Li, C.L., *et al.* (1993). Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 362(6422):761–763.
- Azuma, M., Cayabyab, M., Buck, D., *et al.* (1992). CD28 interaction with B7 costimulates primary allogeneic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small, resting T lymphocytes. *J Exp Med* 175(2):353–360.
- Azuma, M., Ito, D., Yagita, H., *et al.* (1993). B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 366(6450):76–79.

- Bach, F.H., Voynow, N.K. (1966). One-way stimulation in mixed leukocyte cultures. *Science* 153(3735):545–547.
- Bachmann, M. F., Zinkernagel, R. M. (1997). Neutralizing antiviral B-cell responses. *Ann Rev Immunol* 15:235–270.
- Baert, F., Noman, M., Vermeire, G., *et al.* (2003). Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med* 348(7):601–608.
- Bailey, L., Moreno, L., Manigold, T., *et al.* (2013). A simple whole blood bioassay detects cytokine responses to anti-CD28SA and anti-CD52 antibodies. *J Pharmacol Toxicol Methods* 68(2):231–239.
- Bajtay, Z., Csomor, E., Sándor, N., *et al.* (2006) Expression and role of Fc- and complement-receptors on human dendritic cells. *Immunol Lett* 104(1-2):46–52.
- Baker, M.P., Reynolds, H.M., Lumicisi, B., *et al.* (2010). Immunogenicity of protein therapeutics – The key causes, consequences and challenges. *Self Nonself* 1(4):314–322.
- Baldo, B.A. (2013). Adverse events to monoclonal antibodies used for cancer therapy: Focus on hypersensitivity responses. *Oncoimmunology* 2(10):e26333.
- Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., *et al.* (1994). The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* 12:881–922.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., *et al.* (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767–811.
- Banchereau, J., Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392(6673):245–252.
- Bánki, Z., Kacani, L., Müllauer, B., *et al.* (2003). Cross-linking of CD32 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells via NF-kappa B signaling pathway. *J Immunol* 170(8):3963–3970.
- Barnett, A.N., Hadjianastassiou, V.G., Mamode, N. (2013). Rituximab in renal transplantation. *Transpl Int* 26(6):563–575.
- Bartholomaeus, P., Semmler, L.Y., Bukur, T., *et al.* (2014). Cell contact-dependent priming and Fc interaction with CD32+ immune cells contribute to the TGN1412-triggered cytokine response. *J Immunol* 192(5):2091–2098.
- Bell, D., Young, J.W., Banchereau, J. (1999). Dendritic cells. *Adv Immunol* 72:255–324.
- Bender, A., Sapp, M., Schuler, G., *et al.* (1996). Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods* 196(2):121–135.
- Bender, N.K., Heilig, C.E., Dröll, B., *et al.* (2007). Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. *Rheumatol Int* 27(3):269–274.
- Berek, C., Milstein, C. (1987). Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response. *Immunol Rev* 96:23–41.

- Berger, T.G., Feuerstein, B., Strasser, E., *et al.* (2002). Large-scale generation of mature monocyte-derived dendritic cells for clinical application in cell factories. *J Immunol Methods* 268(2):131–140.
- Bertho, N., Blancheteau, V.M., Setterblad, N., *et al.* (2002). MHC class II-mediated apoptosis of mature dendritic cells proceeds by activation of the protein kinase C-delta isoenzyme. *Int Immunol* 14(8):935–942.
- Bertho, N., Drénou, B., Laupeze, B., *et al.* (2000). HLA-DR-mediated apoptosis susceptibility discriminates differentiation stages of dendritic/monocytic APC. *J Immunol* 164(5):2379–2385.
- Beyersdorf, N., Gaupp, S., Balbach, K., *et al.* (2005). Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 202(3):445–455.
- Bliss, M. (1993). The history of insulin. *Diabetes Care* 16(Suppl 3):4–7.
- Bobbio-Pallavicini, F., Caporali, R., Alpini, C., *et al.* (2007). High IgA rheumatoid factor levels are associated with poor clinical response to tumour necrosis factor alpha inhibitors in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 66(3):302–307.
- Bour-Jordan, H., Bluestone, J.A. (2002). CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *J Clin Immunol* 22(1):1–7.
- Boven, K., Stryker, S., Knight, J., *et al.* (2005). The increased incidence of pure red cell aplasia with an Eprex formulation in uncoated rubber stopper syringes. *Kidney Int* 67(6):2346–2353.
- Brandtzaeg, P. (2003). Role of secretory antibodies in the defence against infections. *Int J Med Microbiol* 293(1):3–15.
- Brennan, F.R., Morton, L.D., Spindeldreher, S., *et al.* (2010). Safety and immunotoxicity assessment of immunomodulatory monoclonal antibodies. *MAbs* 2(3):233–255.
- Brennan, F.R., Shaw, L., Wing, M.G., *et al.* (2004). Preclinical safety testing of biotechnology-derived pharmaceuticals: understanding the issues and addressing the challenges. *Mol Biotechnol* 27(1):59–74.
- Bromelow, K.V., Hirst, W., Mendes, R.L., *et al.* (2001). Whole blood assay for assessment of the mixed lymphocyte reaction. *J Immunol Methods* 247(1-2):1–8.
- Bugelski, P.J., Achuthanandam, R., Capocasale, R.J., *et al.* (2009). Monoclonal antibody-induced cytokine-release syndrome. *Expert Rev Clin Immunol* 5(5):499–521.
- Bullwinkel, J., Lüdemann, A., Debarry, J., *et al.* (2011). Epigenotype switching at the CD14 and CD209 genes during differentiation of human monocytes to dendritic cells. *Epigenetics* 6(1):45–51.
- Burgdorf, S., Lukacs-Kornek, V., Kurts, C. (2006). The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *J Immunol* 176(11):6770–6776.
- Burnet, F.M. (1959). The clonal selection theory of acquired immunity. *Vanderbilt University Press* xiii:209pp.

- Buyel, J.F., Twyman, R.M., Fischer, R. (2017). Very-large-scale production of antibodies in plants: The biologization of manufacturing. *Biotechnol Adv* 35(4):458–465.
- Cantrell, D.A., Smith, K.A. (1984). The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. *Science* 224(4655):1312–1316.
- Carpenter, P.A., Pavlovic, S., Tso, J.Y., *et al.* (2000). Non-Fc receptor-binding humanized anti-CD3 antibodies induce apoptosis of activated human T cells. *J Immunol* 165(11):6205–6213.
- Carroll, M.C. (1998). The role of complement and complement receptors in induction and regulation of Immunity. *Annu Rev of Immunol* 16:545–568.
- Caruso, A., Licenziati, S., Corulli, M., *et al.* (1997). Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry* 27(1):71–76.
- Casadevall, N., Nataf, J., Viron, B., *et al.* (2002). Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med* 346(7):469–475.
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., *et al.* (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180(5):1841–1847.
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., *et al.* (1996). CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF + TNF alpha. *J Exp Med* 184(2):695–706.
- Cavagnaro, J.A. (2002). Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 1(6):469–475.
- Cella, M., Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (1997). Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 9(1):10–16.
- Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., *et al.* (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 184(2):747–752.
- Cerny, T., Borisch, B., Introna, M., *et al.* (2002). Mechanism of action of rituximab. *Anticancer Drugs* 13(Suppl 2):S3–10.
- Chance, R.E., Frank, B.H. (1993). Research, development, production, and safety of biosynthetic human insulin. *Diabetes Care* 16(Suppl 3):133–142.
- Chance, R.E., Root, M.A., Galloway, J.A. (1976). The immunogenicity of insulin preparations. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 205:185–198.
- Chang, E.Y., Guo, B., Doyle, S.E., *et al.* (2007). Cutting edge: involvement of the type I IFN production and signaling pathway in lipopolysaccharide-induced IL-10 production. *J Immunol* 178(11):6705–6709.
- Chapman, K., Pullen, N., Graham, M., *et al.* (2007). Preclinical safety testing of monoclonal antibodies: the significance of species relevance. *Nat Rev Drug Discov* 6(2):120–126.

- Chapuis, F., Rosenzweig, M., Yagello, M., *et al.* (1997). Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol* 27(2):431–441.
- Chatenoud, L., Ferran, C., Legendre, C., *et al.* (1990). In vivo cell activation following OKT3 administration. Systemic cytokine release and modulation by corticosteroids. *Transplantation* 49(4):697–702.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., *et al.* (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198(12):1875–1886.
- Chen, Y., Yang, C., Jin, N., *et al.* (2007). Terminal complement complex C5b-9-treated human monocyte-derived dendritic cells undergo maturation and induce Th1 polarization. *Eur J Immunol* 37(1):167–176.
- Chung, C.H. (2008). Managing premedications and the risk for reactions to infusional monoclonal antibody therapy. *Oncologist* 13(6):725–732.
- Chung, C.H., Mirakhor, B., Chan, E., *et al.* (2008). Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *N Engl J Med* 358(11):1109–1117.
- Chung, J. (2017). Special issue on therapeutic antibodies and biopharmaceuticals. *Exp Mol Med* 49(3):e304.
- Cleland, J.L., Powell, M.F., Shire, S.J. (1993). The development of stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 10(4):307–377.
- Cole, M.S., Anasetti, C., Tso, J.Y. (1997). Human IgG2 variants of chimeric anti-CD3 are nonmitogenic to T cells. *J Immunol* 159(7):3613–3621.
- Collin, M., McGovern, N., Haniffa, M. (2013). Human dendritic cell subsets. *Immunology* 140(1):22–30.
- Coombs, R.R.A., Gell, P.G.H. (1968). Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity disease. *Clin Asp Immunol*:575–596.
- Cooper, N.R. (1985). The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv Immunol* 37:151–216.
- Cooper, N.R., Nemerow, G.R. (1985). Complement effector mechanisms in health and disease. *J Invest Dermatol* 85(1):39–46.
- Crivellato, E., Vacca, A., Ribatti, D. (2004). Setting the stage: an anatomist's view of the immune system. *Trends Immunol* 25(4):210–217.
- Csomor, E., Bajtay, Z., Sándor, N., *et al.* (2007) Complement protein C1q induces maturation of human dendritic cells. *Mol Immunol* 44(13):3389–3397.
- Cumberbatch, M., Kimber, I. (1992). Dermal tumour necrosis factor-alpha induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans' cell migration. *Immunology* 75(2):257–263.
- Curtis, J.E., Hersh, E.M. (1972). The human secondary immune response to keyhole limpet hemocyanin. *Clin exp Immunol* 10(1):171–177.

- Curtis, J.E., Hersh, E.M., Harris, J.E., *et al.* (1970). The human primary immune response to keyhole limpet hemocyanin: Interrelationships of delayed hypersensitivity, antibody response and in vitro blast transformation. *Clin Exp Immunol* 6(4):473–491.
- D'Arcy, C.A., Mannik, M. (2001). Serum sickness secondary to treatment with the murine-human chimeric antibody IDEC-C2B8 (rituximab). *Arthritis Rheum* 44(7):1717–1718.
- da Silva Correia, J., Soldau, K., Christen, U., *et al.* (2001). Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. Transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem* 276(24): 21129–21135.
- DeFranco, A.L. (1987). Molecular aspects of B-Lymphocyte activation. *Ann Rev Cell Biol* 3: 143–178.
- De Groot, A.S., Scott, D.W. (2007). Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends Immunol* 28(11):482–490.
- De Groote, D., Zangerle, P.F., Gevaert, Y., *et al.* (1992). Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine* 4(3):239–248.
- Delluc, S., Ravot, G., Maillere, B. (2011). Quantitative analysis of the CD4 T-cell repertoire specific to therapeutic antibodies in healthy donors. *FASEB J* 25(6):2040–2048.
- Del Prete, G., De Carli, M., Almerigogna, F., *et al.* (1993). Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 150(2):353–360.
- Deng, N., Mosmann, T.R. (2015). Optimization of the Cytokine Secretion Assay for human IL-2 in single and combination assays. *Cytometry A* 87(8):777–783.
- Descotes, J. (2006). Methods of evaluating immunotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2(2):249–259.
- Descotes, J. (2009). Immunotoxicity of monoclonal antibodies. *MAbs* 1(2):104–111.
- Descotes, J., Vial, T. (2007). Flu-like syndromes and cytokines. In: Cytokines in Human Health: Immunotoxicology, Pathology and Therapeutic Applications; House, R.V., Descotes, J., eds. Totowa, N.J.: *Humana Press*:193–204.
- Dhir, V., Fort, M., Mahmood, A., *et al.* (2012). A predictive biomimetic model of cytokine release induced by TGN1412 and other therapeutic monoclonal antibodies. *J Immunotoxicol* 9(1):34–42.
- Dhodapkar, K.M., Kaufman, J.L., Ehlers, M., *et al.* (2005). Selective blockade of inhibitory Fcγ receptor enables human dendritic cell maturation with IL-12p70 production and immunity to antibody-coated tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(8):2910–2915.
- Dilioglou, S., Cruse, J.M., Lewis, R.E. (2003). Function of CD80 and CD86 on monocyte- and stem cell-derived dendritic cells. *Exp Mol Pathol* 75(3):217–227.
- Dillman, R.O. (1999). Infusion reactions associated with the therapeutic use of monoclonal antibodies in the treatment of malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 18(4):465–471.

- Dokter, W.H., Esselink, M.T., Sierdsema, S.J., *et al.* (1993). Transcriptional and post-transcriptional regulation of the interleukin-4 and interleukin-3 genes in human T cells. *Blood* 81(1):35–40.
- Drénou, B., Blancheteau, V., Burgess, D.H., *et al.* (1999). A caspase-independent pathway of MHC class II antigen-mediated apoptosis of human B lymphocytes. *J Immunol* 163(8):4115–4124.
- Dutton, R.W., Bradley, L.M., Swain, S.L. (1998). T cell memory. *Annu Rev Immunol* 16:201–223.
- Dwyer, J.M., Johnson, C. (1981). The use of concanavalin A to study the immunoregulation of human T cells. *Clin Exp Immunol* 46(2):237–249.
- Eastwood, D., Bird, C., Dilger, P., *et al.* (2013). Severity of the TGN1412 trial disaster cytokine storm correlated with IL-2 release. *Br J Clin Pharmacol* 76(2):299–315.
- Eastwood, D., Findlay, L., Poole, S., *et al.* (2010). Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4+ effector memory T-cells. *Br J Pharmacol* 161(3):512–526.
- Ecker, D.M., Jones, S.D., Levine, H.L. (2015). The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs* 7(1):9–14.
- Elvin, J.G., Couston, R.G., van der Walle, C.F. (2013). Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. *Int J Pharm* 440(1):83–98.
- Engering, A., Geijtenbeek, T.B., van Vliet, S.J., *et al.* (2002). The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol* 168(5):2118–2126.
- Exley, M., Terhorst, C., Wileman, T. (1991). Structure, assembly and intracellular transport of the T cell receptor for antigen. *Semin Immunol* 3(5):283–297.
- Figdor, C.G., van Kooyk, Y., Adema, G.J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* 2(2):77–84.
- Figueiredo, I.T., Morel, J., Sany, J., *et al.* (2008). Maintenance and tolerability of infliximab in a cohorte of 152 patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 26(1):18–23.
- Finco, D., Grimaldi, C., Fort, M., *et al.* (2014). Cytokine release assays: current practices and future directions. *Cytokine* 66(2):143–155.
- Findlay, L., Eastwood, D., Ball, C., *et al.* (2011a). Comparison of novel methods for predicting the risk of pro-inflammatory clinical infusion reactions during monoclonal antibody therapy. *J Immunol Methods* 371(1-2):134–142.
- Findlay, L., Eastwood, D., Stebbings, R., *et al.* (2010). Improved in vitro methods to predict the in vivo toxicity in man of therapeutic monoclonal antibodies including TGN1412. *J Immunol Methods* 352(1-2):1–12.
- Findlay, L., Sharp, G., Fox, B., *et al.* (2011b). Endothelial cells co-stimulate peripheral blood mononuclear cell responses to monoclonal antibody TGN1412 in culture. *Cytokine* 55(1):141–151.

- Fontes, A.M., Orellana, M.D., Palma, P.V.B., *et al.* (2006). Maturation of dendritic cells following exposure to different maturational stimuli. *Rev bras hematol hemoter* 28(2):89–96.
- Freudenthal, P.S., Steinman, R.M. (1990). The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(19):7698–7702.
- Gaffen, S.L. (2001). Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine* 14(2):63–77.
- Gallo, R.L., Murakami, M., Ohtake, T., *et al.* (2002). Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J Allergy Clin Immunol* 110(6):823–831.
- Gallucci, S., Matzinger, P. (2001). Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 13(1):114–119.
- Gaston, R.S., Deierhoi, M.H., Patterson, T., *et al.* (1991). OKT3 first-dose reaction: association with T cell subsets and cytokine release. *Kidney Int* 39(1):141–148.
- Geijtenbeek, T.B., Gringhuis, S.I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* 9(7):465–479.
- Geijtenbeek, T.B., Krooshoop, D.J., Bleijs, D.A., *et al.* (2000a). DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* 1(4):353–357.
- Geijtenbeek, T.B., Torensma, R., van Vliet, S.J., *et al.* (2000b). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100(5):575–585.
- Genser, B., Cooper, P.J., Yazdanbakhsh, M., *et al.* (2007). A guide to modern statistical analysis of immunological data. *BMC Immunol* 8:27.
- George, T.J.Jr., Laplant, K.D., Walden, E.O., *et al.* (2010). Managing cetuximab hypersensitivity-infusion reactions: incidence, risk factors, prevention, and retreatment. *J Support Oncol* 8(2):72–77.
- Germain, R.N. (1986). Immunology. The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature* 322(6081):687–689.
- Germain, R.N. (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76(2):287–299.
- Germain, R.N., Castellino, F., Han, R., *et al.* (1996). Processing and presentation of endocytically acquired protein antigens by MHC class II and class I molecules. *Immunol Rev* 151:5–30.
- Germain, R.N., Margulies, D.H. (1993). The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* 11:403–450.
- Giese, C., Lubitz, A., Demmler, C.D., *et al.* (2010). Immunological substance testing on human lymphatic micro-organoids in vitro. *J Biotechnol* 148(1):38–45.
- Giese, C., Marx, U. (2007). Artificial human lymphnode. A device for generation of human antibodies and testing for immune functions in vitro. *Cell Technol Cell Prod* 3:285–290.

- Giezen, T.J., Mantel-Teeuwisse, A.K., Straus, S.M., *et al.* (2008). Safety-related regulatory actions for biologicals approved in the United States and the European Union. *JAMA* 300(16):1887–1896.
- Gilliet, M., Kleinhans, M., Lantelme, E., *et al.* (2003). Intranodal injection of semimature monocyte-derived dendritic cells induces T helper type 1 responses to protein neoantigen. *Blood* 102(1):36–42.
- Goldstein, G. (1987). Overview of the development of orthoclone OKT3 monoclonal antibody for therapeutic use in transplantation. *Transplant Proc* 19(2 Suppl 1):1–6.
- Gollub, J., Sherlock, G. (2006). Clustering microarray data. *Methods Enzymol* 411:194–213.
- Goodier, M.R., Londei, M. (2001). Low concentrations of lipopolysaccharide synergize with peptides to augment human T-cell proliferation and can prevent the induction of non-responsiveness by CTLA4-Ig. *Immunology* 102(1):15–23.
- Goodnow, C.C. (2001). Pathways for self-tolerance and the treatment of autoimmune diseases. *Lancet* 357(9274):2115–2121.
- Gough, P.J., Gordon, S. (2000). The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes Infect* 2(3):305–311.
- Greenfield, E.A., Nguyen, K.A., Kuchroo, V.K. (1998). CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol* 18(5):389–418.
- Grewal, I.S., Xu, J., Flavell, R.A. (1995). Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature* 378(6557):617–620.
- Gribben, J.G., Devereux, S., Thomas, N.S., *et al.* (1990). Development of antibodies to unprotected glycosylation sites on recombinant human GM-CSF. *Lancet* 335(8687):434–437.
- Grimaldi, C., Finco, D., Fort, M.M., *et al.* (2016). Cytokine release: A workshop proceedings on the state-of-the-science, current challenges and future directions. *Cytokine* 85:101–108.
- Hansel, T.T., Kropshofer, H., Singer, T., *et al.* (2010). The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov* 9(4):325–338.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., *et al.* (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6(11):1123–1132.
- Harris, J.R., Markl, J. (1999). Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron* 30(6):597–623.
- Hellman, P., Eriksson, H. (2007). Early activation markers of human peripheral dendritic cells. *Hum Immunol* 68(5):324–333.
- Hermeling, S., Crommelin, D.J., Schellekens, H., *et al.* (2004). Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. *Pharm Res* 21(6):897–903.
- Herscovitz, H.B., Harold, W.W., Stavitsky, A.B. (1972). Immunochemical and immunogenic properties of a purified keyhole limpet haemocyanin. *Immunology* 22(1):51–61.

- Hessel, E.M., van Oosterhout, A.J., Hofstra, C.L., *et al.* (1995). Bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness after ovalbumin inhalation in sensitized mice. *Eur J Pharmacol* 293(4):401–412.
- Hirano, T. (1998). Interleukin 6 and its Receptor: Ten years later. *Int Rev Immunol* 16(3-4):249–284.
- Hirsch, M.S., Phillips, S.M., Solnik, C., *et al.* (1972). Activation of leukemia viruses by graft-versus-host and mixed lymphocyte reactions in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 69(5):1069–1072.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., *et al.* (1999). Cutting edge: toll-like receptor 4 (TLR4) deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. *J Immunol* 162(7):3749–3752.
- Huppa, J.B., Davis, M.M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 3(12):973–983.
- Hussain, K., Hargreaves, C.E., Roghanian, A., *et al.* (2015). Upregulation of FcγRIIb on monocytes is necessary to promote the superagonist activity of TGN1412. *Blood* 125(1):102–110.
- Hwang, W.Y., Foote, J. (2005). Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* 36(1):3–10.
- Hünig, T. (2012). The storm has cleared: lessons from the CD28 superagonist TGN1412 trial. *Nat Rev Immunol* 12(5):317–318.
- Hünig, T. (2016). The rise and fall of the CD28 superagonist TGN1412 and its return as TAB08: a personal account. *FEBS J* 283(18):3325–3334.
- Inaba, K., Metlay, J.P., Crowley, M.T., *et al.* (1990). Dendritic cells as antigen presenting cells in vivo. *Int Rev Immunol* 6(2-3):197–206.
- Inaba, K., Steinman, R.M. (1985). Protein-specific helper T-lymphocyte formation initiated by dendritic cells. *Science* 229(4712):475–479.
- Ishida, T., Mizushima, S., Azuma, S., *et al.* (1996). Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an aminoterminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J Biol Chem* 271(46):28745–28748.
- Jacquemin, M.G., Saint-Remy, J.M. (1998). Factor VIII immunogenicity. *Haemophilia* 4(4):552–557.
- Jakobovits, A., Amado, R.G., Yang, X., *et al.* (2007). From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nat Biotechnol* 25(10):1134–1143.
- Janeway, C.A.Jr. (1992a). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 13(1):11–16.
- Janeway, C.A.Jr. (1992b). The T cell receptor as a multicomponent signaling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 10:645–674.
- Janeway, C.A.Jr., Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197–216.

- John, J., Hutchinson, J., Dalgleish, A., *et al.* (2003). Cryopreservation of immature monocyte-derived dendritic cells results in enhanced cell maturation but reduced endocytic activity and efficiency of adenoviral transduction. *J Immunol Methods* 272(1-2):35–48.
- Jones, J.C., Settles, E.W., Brandt, C.R., *et al.* (2011). Virus aggregating peptide enhances the cell-mediated response to influenza virus vaccine. *Vaccine* 29(44):7696–7703.
- Jonuleit, H., Kühn, U., Müller, G., *et al.* (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 27(12):3135–3142.
- Joubert, M.K., Hokom, M., Eakin, C., *et al.* (2012). Highly aggregated antibody therapeutics can enhance the in vitro innate and late-stage T-cell immune responses. *J Biol Chem* 287(30):25266–25279.
- Kato, M., Neil, T.K., Fearnley, D.B., *et al.* (2000). Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cells. *Int Immunol* 12(11):1511–1519.
- Kawai, T., Akira, S. (2007). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13(11):460–469.
- Keane, J., Gershon, S., Wise, R.P., *et al.* (2001). Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 345(15):1098–1104.
- Kiertscher, S.M., Roth, M.D. (1996). Human CD14+ leukocytes acquire the phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4. *J Leukoc Biol* 59(2):208–218.
- Kievit, W., Fransen, J., Oerlemans, A.J., *et al.* (2007). The efficacy of anti-TNF in rheumatoid arthritis, a comparison between randomised controlled trials and clinical practice. *Ann Rheum Dis* 66(1):1473–1478.
- Kinch, M.S. (2015). An overview of FDA-approved biologics medicines. *Drug Discov Today* 20(4):393–398.
- Kobayashi, T., Walsh, M.C., Choi, Y. (2004). The role of TRAF6 in signal transduction and the immune response. *Microbes Infect* 6(14):1333–1338.
- Kobayashi, T., Walsh, P.T., Walsh, M.C., *et al.* (2003). TRAF6 is a critical factor for dendritic cell maturation and development. *Immunity* 19(3):353–363.
- Kontsek, P., Liptakova, H., Kontsekova, E. (1999). Immunogenicity of interferon- α 2 in therapy: structural and physiological aspects. *Acta Virol* 43(1):63–70.
- Kouskoff, V., Lacaud, G., Nemazee, D. (2000). T-Cell-independent rescue of B-lymphocytes from peripheral immune tolerance. *Science* 287(5462):2501–2503.
- Kruse, M., Rosorius, O., Krätzer, F., *et al.* (2000a). Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity. *J Virol* 74(15):7127–7136.
- Kruse, M., Rosorius, O., Krätzer, F., *et al.* (2000b). Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA. *J Exp Med* 191(9):1581–1590.

- Kulkarni, H.S., Kasi, P.M. (2012). Rituximab and cytokine release syndrome. *Case Rep Oncol* 5:134–141.
- Köhler, G., Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256(5517):495–497.
- Ladisch, M.R., Kohlmann, K.L. (1992). Recombinant human insulin. *Biotechnol Prog* 8(6):469–478.
- Lanzavecchia, A. (1990). Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 8:773–793.
- Lauener, R.P., Goyert, S.M., Geha, R.S., *et al.* (1990). Interleukin-4 down-regulates the expression of CD14 in normal human monocytes. *Eur J Immunol* 20(11):2375–2381.
- Laupéze, B., Fardel, O., Onno, M., *et al.* (1999). Differential expression of major histocompatibility complex class Ia, Ib, and II molecules on monocytes-derived dendritic and macrophagic cells. *Hum Immunol* 60(7):591–597.
- Lazarski, C.A., Chaves, F.A., Jenks, S.A., *et al.* (2005). The kinetic stability of MHC class II:peptide complexes is a key parameter that dictates immunodominance. *Immunity* 23(1):29–40.
- Leader, B., Baca, Q.J., Golan, D.E. (2008). Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nat Rev Drug Discov* 7(1):21–39.
- Lebrec, H., Hock, M.B., Sundsmo, J.S., *et al.* (2014). T-cell-dependent antibody responses in the rat: forms and sources of keyhole limpet hemocyanin matter. *J Immunotoxicol* 11(3):213–221.
- Lechmann, M., Berchtold, S., Hauber, J., *et al.* (2002a). CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol* 23(6):273–275.
- Lechmann, M., Zinser, E., Golka, A., *et al.* (2002b). Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol* 129(2):113–118.
- Lee, A.W., Truong, T., Bickham, K., *et al.* (2002). A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine* 20(Suppl.4):A8–22.
- Lee, D.W., Gardner, R., Porter, D.L., *et al.* (2014). Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* 124(2):188–195.
- Lee, W.L., Harrison, R.E., Grinstein, S. (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect* 5(14):1299–1306.
- Leontieva, O.V., Demidenko, Z.N., Blagosklonny, M.V. (2014). Contact inhibition and high cell density deactivate the mammalian target of rapamycin pathway, thus suppressing the senescence program. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(24):8832–8837.
- Levin, D., Constant, S., Pasqualini, T., *et al.* (1993). Role of dendritic cells in the priming of CD4+ T lymphocytes to peptide antigen in vivo. *J Immunol* 151(12):6742–6750.
- Li, D.Y., Gu, C., Min, J., *et al.* (2012). Maturation induction of human peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells. *Exp Ther Med* 4(1):131–134.

- Lièvre, A., Bachet, J.B., Le Corre, D., *et al.* (2006). KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 66(8):3992–3995.
- Lin, C.H., Hünig, T. (2003). Efficient expansion of regulatory T-cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist. *Eur J Immunol* 33(3):626–638.
- Linsley, P.S., Brady, W., Grosmaire, L., *et al.* (1991). Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med* 173(3):721–730.
- Linsley, P.S., Ledbetter, J.A. (1993). The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 11:191–212.
- Liu, W., Putnam, A.L., Xu-Yu, Z., *et al.* (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 203(7):1701–1711.
- Lokshin, A.E., Kalinski, P., Sassi, R.R., *et al.* (2002). Differential regulation of maturation and apoptosis of human monocyte-derived dendritic cells mediated by MHC class II. *Int Immunol* 14(9):1027–1037.
- Looney, R.J., Anolik, J.H., Campbell, D., *et al.* (2004). B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: a phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis Rheum* 50(8):2580–2589.
- Lorré, K., Fransen, L., Ceuppens, J.L. (1992). Interleukin-2 induces tumor necrosis factor-alpha production by activated human T cells via a cyclosporin-sensitive pathway. *Eur Cytokine Netw* 3(3):321–330.
- Luhder, F., Huang, Y., Dennehy, K.M., *et al.* (2003). Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists. *J Exp Med* 197(8):955–966.
- Lund, F.E. (2008). Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. *Curr Opin Immunol* 20(3):332–338.
- Luster, A.D. (2002). The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 14(1):129–135.
- Macdougall, I.C., Roger, S.D., de Francisco, A., *et al.* (2012). Antibody-mediated pure red cell aplasia in chronic kidney disease patients receiving erythropoiesis-stimulating agents: new insights. *Kidney Int* 81(8):727–732.
- Mackler, B.F., Wolstencroft, R.A., Dumonde, D.C. (1972). Concanavalin A as an inducer of human lymphocyte mitogenic factor. *Nat New Biol* 239(92):139–142.
- Maggi, E., Vultaggio, A., Matucci, A. (2011). Acute infusion reactions induced by monoclonal antibody therapy. *Expert Rev Clin Immunol* 7(1):55–63.
- Makino, K., Nakata, J., Kawachi, S., *et al.* (2013). Treatment strategy for reducing the risk of rituximab-induced cytokine release syndrome in patients with intravascular large B-cell lymphoma: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep* 7:280.
- Malek, T.R. (2008). The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 26:453–479.

- Maloney, D.G., Grillo-López, A.J., Bodkin, D.J., *et al.* (1997). IDEC-C2B8: results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 15(10):3266–3274.
- Manickasingham, S.P., Anderton, S.M., Burkhart, C., *et al.* (1998). Qualitative and qualitative effects of CD28/B7-mediated costimulation on naive T cells in vitro. *J Immunol* 161(8):3827–3835.
- Mannering, S.I., Zhong, J., Cheers, C. (2002). T-cell activation, proliferation and apoptosis in primary *Listeria monocytogenes* infection. *Immunology* 106(1):87–95.
- Marchesi, V.T., Gowans, J.L. (1964). The migration of lymphocytes through the endothelium of venules in lymph nodes. An electron microscope study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 159(975):283–290.
- Markowicz, S., Engleman, E.G. (1990). Granulocytemacrophage colony stimulating factor promotes differentiation and survival of human peripheral blood dendritic cells in vitro. *J Clin Invest* 85(3):955–961.
- Matsue, H., Edelbaum, D., Hartmann, A.C., *et al.* (1999). Dendritic cells undergo rapid apoptosis in vitro during antigen-specific interaction with CD4+ T cells. *J Immunol* 162(9):5287–5298.
- Mattern, T., Flad, H.D., Brade, L., *et al.* (1998). Stimulation of human T lymphocytes by LPS is MHC unrestricted, but strongly dependent on B7 interactions. *J Immunol* 160(7):3412–3418.
- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296(5566):301–305.
- McKoy, J.M., Stonecash, R.E., Cournoyer, D., *et al.* (2008). Epoetin-associated pure red cell aplasia: past, present, and future considerations. *Transfusion* 48(8):1754–1762.
- McLaughlin, P., Grillo-López, A.J., Link, B.K., *et al.* (1998). Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 16(8):2825–2833.
- McLellan, A.D., Starling, G.C., Williams, L.A., *et al.* (1995). Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. *Eur J Immunol* 25(7):2064–2068.
- Medzhitov, R., Janeway, C.A. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9(1):4–9.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388(6640):394–397.
- Mehta-Damani, A., Markowicz, S., Engleman, E.G. (1995). Generation of antigen-specific CD4+ T cell lines from naive precursors. *Eur J Immunol* 25(5):1206–1211.
- Millard, A.L., Ittelet, D., Schooneman, F., *et al.* (2003). Dendritic cell KLH loading requirements for efficient CD4+ T-cell priming and help to peptide-specific cytotoxic T-cell response, in view of potential use in cancer vaccines. *Vaccine* 21(9-10):869–876.

- Miller, J.S., Curtsinger, J., Berthold, M., *et al.* (2005). Diminished neoantigen response to keyhole limpet hemocyanin (KLH) vaccines in patients after treatment with chemotherapy or hematopoietic cell transplantation. *Clin Immunol* 117(2):144–151.
- Miller, L., Weissmüller, S., Ringler, E., *et al.* (2015). Danger signal-dependent activation of human dendritic cells by plasma-derived factor VIII products. *Thromb Haemost* 114(2):268–276.
- Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., *et al.* (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11(2):231–238.
- Minami, Y., Kono, T., Miyazaki, T., *et al.* (1993). The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol* 11:245–268.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., *et al.* (1986). Two types of murine helper t-cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136(7):2348–2357.
- Mosmann, T.R., Coffman, R.L. (1989). Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion leads to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145–173.
- Movafagh, A., Heydary, H., Mortazavi-Tabatabaei, S.A., *et al.* (2011). The significance application of indigenous phytohemagglutinin (PHA) mitogen on metaphase and cell culture procedure. *Iran J Pharm Res* 10(4):895–903.
- Mukovozov, I., Sabljic, T., Hortelano, G., *et al.* (2008). Factors that contribute to the immunogenicity of therapeutic recombinant human proteins. *Thromb Haemost* 99(5):874–882.
- Mullard, A. (2017). 2016 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov* 16(2):73–76.
- Murphy, K.M., Reiner, S.L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2(12):933–944.
- O'Garra, A. (1998). Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 8(3):275–283.
- Okada, T., Miller, M.J., Parker, I., *et al.* (2005). Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *PLoS Biol* 3(6):e150.
- O'Sullivan, B., Thomas, R. (2003). Recent advances on the role of CD40 and dendritic cells in immunity and tolerance. *Curr Opin Hematol* 10(4):272–278.
- Paetkau, V., Mills, G., Gerhart, S., *et al.* (1976). Proliferation of murine thymic lymphocytes in vitro is mediated by the Concanavalin A induced release of a lymphokine (costimulator). *J Immunol* 117(4):1320–1324.
- Palacios, R. (1982). Concanavalin A triggers T Lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. *J Immunol* 128(1):337–342.
- Pamer, E., Cresswell, P. (1998). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 16:323–358.
- Parish, C.R. (1999). Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol* 77(6):499–508.

- Parker, D.C. (1993). T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 11:331–360.
- Peng, A., Gaitonde, P., Kosloski, M.P., *et al.* (2009). Effect of route of administration of human recombinant factor VIII on its immunogenicity in Hemophilia A mice. *J Pharm Sci* 98(12):4480–4484.
- Pereira, L.F., de Souza, A.P., Borges, T.J., *et al.* (2011). Impaired in vivo CD4+ T cell expansion and differentiation in aged mice is not solely due to T cell defects: decreased stimulation by aged dendritic cells. *Mech Ageing Dev* 132(4):187–194.
- Perussia, B. (1996). The Cytokine Profile of Resting and Activated NK Cells. *Methods* 9(2):370–378.
- Peters, M., Dudziak, K., Stiehm, M., *et al.* (2010). T-cell polarization depends on concentration of the danger signal used to activate dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 88(5):537–544.
- Pfeiffer, A., Böttcher, A., Orsó, E., *et al.* (2001). Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligandspecific receptor clustering in rafts. *Eur J Immunol* 31(11):3153–3164.
- Pickl, W.F., Majdic, O., Kohl, P., *et al.* (1996). Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. *J Immunol* 157(9):3850–3859.
- Piro, L.D., White, C.A., Grillo-Lopez, A.J., *et al.* (1999). Extended Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) therapy for relapsed or refractory low-grade follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 10(6):655–661.
- Plosker, G.L., Figgitt, D.P. (2003). Rituximab: A review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Drugs* 63(8):803–843.
- Poltorak, A., He, X.L., Smirnova, I., *et al.* (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR4 gene. *Science* 282(5396):2085–2088.
- Ponce, R., Abad, L., Amaravadi, L., *et al.* (2009). Immunogenicity of biologically-derived therapeutics: assessment and interpretation of nonclinical safety studies. *Regul Toxicol Pharmacol* 54(2):164–182.
- Prabhakar, S.S., Muhlfelder, T. (1997). Antibodies to recombinant human erythropoietin causing pure red cell aplasia. *Clin Nephrology* 47(5):331–335.
- Prescott, R., Nakai, H., Saenko, E.L., *et al.* (1997). The inhibitor antibody response is more complex in hemophilia A patients than in most nonhemophiliacs with factor VIII autoantibodies. *Blood* 89(10):3663–3671.
- Presicce, P., Taddeo, A., Conti, A., *et al.* (2008). Keyhole limpet hemocyanin induces the activation and maturation of human dendritic cells through the involvement of mannose receptor. *Mol Immunol* 45(4):1136–1145.
- Pullen, S.S., Dang, T.T., Crute, J.J., *et al.* (1999). CD40 signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). Binding site specificity and activation of downstream pathways by distinct TRAFs. *J Biol Chem* 274(20):14246–14254.
- Radbruch, A., Mechtold, B., Thiel, A., *et al.* (1994). High gradient magnetic cell sorting. *Meth Cell Biol* 42:387–403.

- Radstake, T.R., Svenson, M., Eijsbouts, A.M., *et al.* (2009). Formation of antibodies against infliximab and adalimumab strongly correlates with functional drug levels and clinical responses in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 68(11):1739–1745.
- Rafi, A., Castle, S.C., Uyemura, K., *et al.* (2003). Immune dysfunction in the elderly and its reversal by antihistamines. *Biomed Pharmacother* 57(5-6):246–250.
- Ratanji, K.D., Derrick, J.P., Dearman, R.J., *et al.* (2014). Immunogenicity of therapeutic proteins: influence of aggregation. *J Immunotoxicol* 11(2):99–109.
- Ravetch, J.V., Kinet, J.P. (1991). Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 9:457–492.
- Raychaudhuri, S., Stuart, J.M., Altman, R.B. (2000). Principal components analysis to summarize microarray experiments: application to sporulation time series. *Pac Symp Biocomput*:455–466.
- Reichert, J.M., Rosensweig, C.J., Faden, L.B., *et al.* (2005). Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat Biotechnol* 23(9):1073–1078.
- Reis, E.S., Barbuto, J.A., Köhl, J., *et al.* (2008). Impaired dendritic cell differentiation and maturation in the absence of C3. *Mol Immunol* 45(7):1952–1962.
- Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., *et al.* (2015). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitization safety assessment. *Toxicol In Vitro* 29(1):259–270.
- Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C.L., *et al.* (1998). Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med* 188(11):2175–2180.
- Ritter, G., Cohen, L.S., Williams, C.Jr., *et al.* (2001). Serological analysis of human anti-human antibody responses in colon cancer patients treated with repeated doses of humanized monoclonal antibody A33. *Cancer Res* 61(18):6851–6859.
- Rogers, P.R., Dubey, C., Swain, S.L. (2000). Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J Immunol* 164(5):2338–2346.
- Rogers, W.O., Weaver, C.T., Kraus, L.A., *et al.* (1997). Visualization of antigen-specific T cell activation and cytokine expression in vivo. *J Immunol* 158(2):649–657.
- Romani, N., Koide, S., Crowley, M., *et al.* (1989). Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 169(3):1169–1178.
- Romani, N., Reider, D., Heuer, M., *et al.* (1996). Generation of mature dendritic cells from human blood: An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 196(2):137–151.
- Rombach-Riegraf, V., Karle, A.C., Wolf, B., *et al.* (2014). Aggregation of human recombinant monoclonal antibodies influences the capacity of dendritic cells to stimulate adaptive T-cell responses in vitro. *PLoS One* 9(1):e86322.
- Rosenberg, A.S. (2006). Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J* 8(3):E501–507.

- Ross, C., Clemmesen, K.M., Svenson, M., *et al.* (2000). Immunogenicity of interferon-beta in multiple sclerosis patients: influence of preparation, dosage, dose frequency, and route of administration. Danish Multiple Sclerosis Study Group. *Ann Neurol* 48(5):706–712.
- Rothwell, T.L., Love, R.J. (1975). Studies of the response of basophil and eosinophil leucocytes and mast cells to the nematode *Trichostrongylus colubriformis*. II. Changes in cell numbers following infection of thymectomised and adoptively or passively immunized guinea-pigs. *J Pathol* 116(3):183–194.
- Rudensky, A.Y. (2011). Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev* 241(1):260–268.
- Ruppert, J., Friedrichs, D., Xu, H., *et al.* (1991). IL-4 decreases the expression of the monocyte differentiation marker CD14, paralleled by an increasing accessory potency. *Immunobiology* 182(5):449–464.
- Ruppert, J., Schütt, C., Ostermeier, D., *et al.* (1993). Down-regulation and release of CD14 on human monocytes by IL-4 depends on the presence of serum or GM-CSF. *Adv Exp Med Biol* 329:281–286.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L. (1959). The principles of humane experimental techniques. Special Edition 1992, ed. *Universities for Animal Welfare, Methuen & Co Ltd., London.*
- Rutault, K., Alderman, C., Chain, B.M., *et al.* (1999). Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. *Free Radic Biol Med* 26(1-2):232–238.
- Rychly, D.J., DiPiro, J.T. (2005). Infections associated with tumor necrosis factor-alpha antagonists. *Pharmacotherapy* 25(9):1181–1192.
- Römer, P.S., Berr, S., Avota, E., *et al.* (2011). Preculture of PBMCs at high cell density increases sensitivity of T-cell responses, revealing cytokine release by CD28 superagonist TGN1412. *Blood* 118(26):6772–6782.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N. (2005). Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. *Int Rev Immunol* 24(3-4):211–226.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., *et al.* (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182(2):389–400.
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179(4):1109–1118.
- Saraiva, M., O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 10(3):170–181.
- Sato, K., Nagayama, H., Tadokoro, K., *et al.* (1999). Interleukin-13 is involved in functional maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *Exp Hematol* 27(2):326–336.
- Sauerborn, M., Brinks, V., Jiskoot, W., *et al.* (2010). Immunological mechanism underlying the immune response to recombinant human protein therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 31(2):53–59.

- Schellekens, H. (2002a). Immunogenicity of therapeutic proteins: clinical implications and future prospects. *Clin Ther* 24(11):1720–1740.
- Schellekens, H. (2002b). Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 1(6):457–462.
- Schellekens, H. (2008). Recombinant human erythropoietins, biosimilars and immunogenicity. *J Nephrol* 21(4):497–502.
- Schellekens, H. (2009). Biosimilar therapeutics – what do we need to consider? *NDT Plus* 2(Suppl 1):i27–36.
- Scherer, K., Spoerl, D., Bircher, A.J. (2010) Adverse drug reactions to biologics. *J Dtsch Dermatol Ges* 8(6):411–426.
- Schernthaner, G. (1993). Immunogenicity and allergenic potential of animal and human insulins. *Diabetes Care* 16(Suppl 3):155–165.
- Schlienger, K., Craighead, N., Lee, K.P., *et al.* (2000). Efficient priming of protein antigen-specific human CD4(+) T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 96(10):3490–3498.
- Schuler, G., Steinman, R.M. (1985). Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* 161(3):526–546.
- Schwab, R., Crow, M.K., Russo, C., *et al.* (1985). Requirements for T cell activation by OKT3 monoclonal antibody: role of modulation of T3 molecules and interleukin 1. *J Immunol* 135(3):1714–1718.
- Schwartz, D.A. (2001). The role of TLR4 in endotoxin responsiveness in humans. *J Endotoxin Res* 7(5):389–393.
- Schwartz, R.H., Mueller, D.L., Jenkins, M.K., *et al.* (1989). T-cell clonal anergy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54(2):605–610.
- Schwartz, R.H. (1997). T cell clonal anergy. *Curr Opin Immunol* 9(3):351–357.
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., *et al.* (2006). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203(7):1693–1700.
- Seifert, G., Reindl, T., Lobitz, S., *et al.* (2006). Fatal course after administration of rituximab in a boy with relapsed ALL: a case report and review of literature. *Haematologica* 91(6 Suppl):ECR23.
- Sénéchal, B., Boruchov, A.M., Reagan, J.L., *et al.* (2004). Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83. *Blood* 103(11):4207–4215.
- Sethu, S., Govindappa, K., Alhaidari, M., *et al.* (2012). Immunogenicity to biologics: mechanisms, prediction and reduction. *Arch Immunol Ther Exp* 60(5):331–344.
- Setterblad, N., Blancheteau, V., Delaguillaumie, A., *et al.* (2004). Cognate MHC-TCR interaction leads to apoptosis of antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 75(6):1036–1044.

- Sgro, C. (1995). Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/ orthoclone OKT3: bibliographic review. *Toxicology* 105(1):23–29.
- Shan, P., Ledbetter, J.A., Press, O.W. (1998). Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood* 91(5):1644–1652.
- Sharma, B. (2004). Technical investigations into the cause of the increased incidence of antibody-mediated pure red cell aplasia associated with Eprex®. *Eur J Hosp Pharm* 5:86–91.
- Siefken, R., Kurrle, R., Schwitzer, R. (1997). CD28-mediated activation of resting human T cells without costimulation of the CD3/TCR complex. *Cell Immunol* 176(1):59–65.
- Singh, S.K. (2011). Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics. *J Pharm Sci* 100(2):354–387.
- Smith, J.B., Cunningham, A.J., Lafferty, K.J., *et al.* (1970). The role of the lymphatic system and lymphoid cells in the establishment of immunological memory. *Aust J Exp Biol Med Sci* 48(1):57–70.
- Smith, J.L., Barker, C.R. (1972). Production of mitogenic factor by Concanavalin A stimulated Lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 12(4):507–514.
- Smith, K.G., Jones, R.B., Burns, S.M., *et al.* (2006). Long-term comparison of rituximab treatment for refractory systemic lupus erythematosus and vasculitis: remission, relapse, and re-treatment. *Arthritis Rheum* 54(9):2970–2982.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., *et al.* (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150(1):76–85.
- Smith, S.L. (1996). Ten years of Orthoclone OKT3 (muromonab-CD3): a review. *J Transpl Coord* 6(3):109–119.
- Sornasse, T., Larenas, P.V., Davis, K.A., *et al.* (1996). Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4+ T cells, analyzed at the single-cell level. *J Exp Med* 184(2):473–483.
- Soulas, P., Woods, A., Jaulhac, B., *et al.* (2005). Autoantigen, innate immunity, and T-cells cooperate to break B-cell tolerance during bacterial infection. *J Clin Invest* 115(8):2257–2267.
- Stebbins, R., Findlay, L., Edwards, C., *et al.* (2007). “Cytokine storm” in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics. *J Immunol* 179(5):3325–3331.
- Steinman, R.M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271–296.
- Steinman, R.M., Swanson, J. (1995). The endocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* 182(2):283–288.
- Stockinger, B., Veldhoen, M. (2007). Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 19(3):281–286.

- Stoeva, S., Schütz, J., Gebauer, W., *et al.* (1999). Primary structure and unusual carbohydrate moiety of functional unit 2-c of keyhole limpet hemocyanin (KLH). *Biochim Biophys Acta* 1435(1-2):94–109.
- Strangfeld, A., Listing, J. (2006). Infection and musculoskeletal conditions: bacterial and opportunistic infections during anti-TNF therapy. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20(6):1181–1195.
- Suntharalingam, G., Perry, M.R., Ward, S., *et al.* (2006). Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 355(10):1018–1028.
- Svensson, M., Stockinger, B., Wick, M.J. (1997). Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *J Immunol* 158(9):4229–4236.
- Szybalski, W., Iyer, V.N. (1964). Cross linking of DNA by enzymatically or chemically activated mitomycins and porfiromycins, bifunctionally alkylating antibiotics. *Fed Proc* 23:946–957.
- Tacke, M., Hanke, G., Hanke, T., *et al.* (1997). CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells in vitro and in vivo without engagement of the T cell receptor: evidence for functionally distinct forms of CD28. *Eur J Immunol* 27(1):239–247.
- Taga, K., Tosato, G. (1992). IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 148(4):1143–1148.
- Tanaka, Y., Yamamoto, K., Takeuchi, T., *et al.* (2007). A multicenter phase I/II trial of rituximab for refractory systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* 17(3):191–197.
- Tax, W.J., Tamboer, W.P., Jacobs, C.W., *et al.* (1997). Role of polymorphic Fc receptor Fcγ/RIIIa in cytokine release and adverse effects of murine IgG1 anti-CD3/T cell receptor antibody (WT31). *Transplantation* 63(1):106–112.
- Thibeault, A., Zekki, H., Mourad, W., *et al.* (1999). Triggering HLA-DR molecules on human peripheral monocytes induces their death. *Cell Immunol* 192(1):79–85.
- Thistlethwaite, J.R., Stuart, J.K., Mayes, J.T., *et al.* (1988) Complications and monitoring of OKT3 therapy. *Am J Kidney Dis* 11(2):112–119.
- Todd, D.J., Helfgott, S.M. (2007). Serum sickness following treatment with rituximab. *J Rheumatol* 34(2):430–433.
- Tomasz, M. (1994). The mitomycins: natural cross-linkers of DNA. In: Neidle, S. and Waring, M.J. (Eds), *Molecular Aspects of Anticancer Drug-DNA antitumour action* 2:312–349.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302(5909):575–581.
- Tovey, M.G., Legrand, J., Lallemand, C. (2011). Overcoming immunogenicity associated with the use of biopharmaceuticals. *Expert Rev Clin Pharmacol* 4(5):623–631.
- Triantafilou, M., Brandenburg, K., Kusumoto, S., *et al.* (2004). Combinational clustering of receptors following stimulation by bacterial products determines LPS responses. *Biochem J* 381(Pt 2):527–536.
- Triantafilou, M., Triantafilou, K. (2002). Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol* 23(6):301–304.

- van Beers, M.M., Bardor, M. (2012). Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins. *Biotechnol J* 7(12):1473–1484.
- van der Kolk, L.E., Grillo-López, A.J., Baars, J.W., *et al.* (2001). Complement activation plays a key role in the side-effects of rituximab treatment. *Br J Haematol* 115(4):807–811.
- van Snick, J. (1990). Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 8:253–278.
- van Voorhis, W.C., Valinskym, J., Hoffman, E., *et al.* (1983). Relative efficacy of human monocytes and dendritic cells as accessory cells for T cell replication. *J Exp Med* 158(1):174–191.
- Vessillier, S., Eastwood, D., Fox, B., *et al.* (2015). Cytokine release assays for the prediction of therapeutic mAb safety in first-in man trials – Whole blood cytokine release assays are poorly predictive for TGN1412 cytokine storm. *J Immunol Methods* 424:43–52.
- Vinuesa, C.G., Tangye, S.G., Moser, B., *et al.* (2005). Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 5(11):853–865.
- Visintin, A., Latz, E., Monks, B.G., *et al.* (2003). Lysines 128 and 132 enable lipopolysaccharide binding to MD2, leading to Toll-like receptor 4-aggregation and signal transduction. *J Biol Chem* 278(48):48313–48320.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., *et al.* (2008). Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9(5):503–510.
- Walker, M., Makropoulos, D., Achuthanandam, R., *et al.* (2010). Recent advances in the understanding of drug-mediated infusion reactions and cytokine release syndrome. *Curr Opin Drug Discov Devel* 13(1):124–135.
- Walker, M., Makropoulos, D., Achuthanandam, R., *et al.* (2011). Development of a human whole blood assay for prediction of cytokine release similar to anti-CD28 superagonists using multiplex cytokine and hierarchical cluster analysis. *Int Immunopharmacol* 11(11):1697–1705.
- Watts, C. (1997). Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 15:821–850.
- Weigle, W.O. (1964). Immunochemical properties of hemocyanin. *Immunochemistry* 1(4):295–302.
- Weiner, G.J. (2010). Rituximab: mechanism of action. *Semin Hematol* 47(2):115–123.
- Weiner, L.M. (2006). Fully human therapeutic monoclonal antibodies. *J Immunother* 29(1):1–9.
- West, R.L., Zelinkova, Z., Wolbink, G.J., *et al.* (2008). Immunogenicity negatively influences the outcome of adalimumab treatment in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 28(9):1122–1126.
- Wilson, R.M., Douglas, C.A., Tattersall, R.B., *et al.* (1985). Immunogenicity of highly purified bovine insulin: a comparison with conventional insulins. *Diabetologia* 28(9):667–670.
- Wing, M. (2008). Monoclonal antibody first dose cytokine release syndromes – mechanisms and prediction. *J Immunotoxicol* 5(1):11–15.

- Wing, M.G., Waldmann, H., Isaacs, J., *et al.* (1995). Ex-vivo whole blood cultures for predicting cytokine-release syndrome: Dependence on target antigen and antibody isotype. *Ther Immunol* 2(4):183–190.
- Winkler, U., Jensen, M., Manzke, O., *et al.* (1999). Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8). *Blood* 94(7):2217–2224.
- Wirguin, I., Suturkova-Milosevic, L., Briani, C., *et al.* (1995). Keyhole limpet hemocyanin contains Gal(b 1-3)-GalNAc determinants that are cross-reactive with the T-antigen. *Cancer Immunol Immunother* 40:307–310.
- Wolf, B., Morgan, H., Krieg, J., *et al.* (2012). A whole blood in vitro cytokine release assay with aqueous monoclonal antibody presentation for the prediction of therapeutic protein induced cytokine release syndrome in humans. *Cytokine* 60(3):828–837.
- Wuhrer, M., Robijn, M.L., Koeleman, C.A., *et al.* (2004). A novel Gal(beta1-4)Gal(beta1-4)Fuc(alpha1-6)-core modification attached to the proximal N-acetylglucosamine of keyhole limpet haemocyanin (KLH) N-glycans. *Biochem J* 378(Pt 2):625–632.
- Xu, D., Alegre, M.L., Varga, S.S., *et al.* (2000). In vitro characterization of five humanized OKT3 effector function variant antibodies. *Cell Immunol* 200(1):16–26.
- Yanagawa, Y., Onoé, K. (2006). Distinct regulation of CD40-mediated interleukin-6 and interleukin-12 productions via mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB-inducing kinase in mature dendritic cells. *Immunology* 117(4):526–535.
- Yang, M., Ma, C., Sun, J., *et al.* (2008). Fucoidan stimulation induces a functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunopharmacol* 8(13-14):1754–1760.
- Young, J.W., Steinman, R.M. (1988). Accessory cell requirements for the mixed-leukocyte reaction and polyclonal mitogens, as studied with a new technique for enriching blood dendritic cells. *Cell Immunol* 111(1):167–182.
- Zamoyska, R. (1998). CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? *Curr Opin Immunol* 10(1):82–87.
- Zhou, L.J., Tedder, T.F. (1995). Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 154(8):3821–3835.
- Zhou, L.J., Tedder, T.F. (1996). CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(6):2588–2592.
- Zinkernagel, R.M., Doherty, P.C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248(5450):701–702.

Websites

Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE), 2017:

https://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/CTCAE_v5_Quick_Reference_5x7.pdf [26.05.2018]

FDA Homepage, 2018: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/>; Suchbegriff: mab [26.05.2018]

ICH guideline S6 (R1): Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals, 1997.

Dokument verfügbar unter:

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S6_R1/Step4/S6_R1_Guideline.pdf [26.05.2018]

ICH guideline S8: Immunotoxicity studies for human pharmaceuticals, 2005.

Dokument verfügbar unter:

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S8/Step4/S8_Guideline.pdf [26.05.2018]

ProImmune, ProStorm™, 2018:

<http://www.proimmune.com/ecommerce/page.php?page=cytokine-storm> [26.05.2018]

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ferner versichere ich, dass diesem Promotionsverfahren keine Promotionsversuche vorausgegangen sind und dass die Dissertation weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung an einer anderen Fakultät vorgelegt wurde.

Ratingen, Juni 2018

Nicole Wöffen